

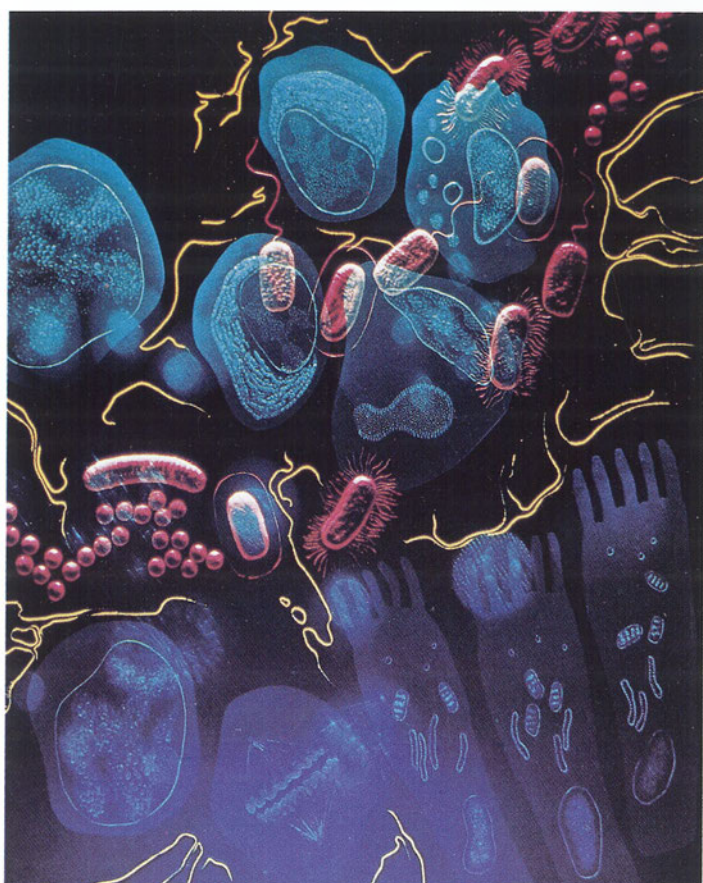
POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE

PL ISSN  
0032-5422

# Advances in Biochemistry

TOM 41, NR 2, 1995

<b>Stanisław Marian Józkiwicz —</b>	
<b>Wspomnienia . . . . .</b>	<b>78</b>
<b>Białkowe inhibitory kinaz cdk . . . . .</b>	<b>80</b>
<b>Regulacja odpowiedzi szoku</b>	
<b>termicznego . . . . .</b>	<b>94</b>
<b>Czynnik transkrypcyjny III A . . . . .</b>	<b>102</b>
<b>Identyfikacja genów różnicowej</b>	
<b>ekspresji . . . . .</b>	<b>110</b>
<b>Regulacja biosyntezy fibrynogenu . . . . .</b>	<b>115</b>
<b>Białka mozaikowe . . . . .</b>	<b>120</b>
<b>Flipazy . . . . .</b>	<b>131</b>
<b>Glikozoaminoglikany . . . . .</b>	<b>139</b>
<b>Skrypt do ćwiczeń — recenzja . . . . .</b>	<b>149</b>
<b>Sprawozdanie . . . . .</b>	<b>151</b>



*Odczynniki biochemiczne z następujących działów:*

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

*Zestawy diagnostyczne:*

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

**Przedstawiciel i wyłączny dystrybutor w Polsce:**

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

## WYDAWCA

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

Drukarnia Naukowo-Techniczna  
Mińska 65  
03-828 Warszawa

## REDAKCJA

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

## RECENZENCI ZESZYTU

Referees of this issue  
JAN BARCISZEWSKI  
(Poznań)  
ANDRZEJ JERZMANOWSKI  
(Warszawa)  
ROBERT MAKUCH  
(Warszawa)  
GRAŻYNA PALAMARCZYK  
(Warszawa)  
SŁAWOMIR PIKUŁA  
(Warszawa)  
KRZYSZTOF ZWIERZ  
(Białystok)

## 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

<b>Profesor Stanisław Marian Józkiwicz – Wspomnienia</b> Professor Stanisław Marian Józkiwicz — Obituary . . . . .	78
<b>Regulacja cyklu komórkowego — udział białkowych inhibitorów kinaz cyklino-zależnych</b> Regulation of cell cycle — involvement of protein inhibitors of cyclin-dependent kinase BARBARA GRZELAKOWSKA-SZTABERT . . . . .	80
<b>Regulacja odpowiedzi szoku termicznego <i>Escherichia coli</i></b> Regulation of the <i>Escherichia coli</i> heat shock response KRZYSZTOF LIBEREK . . . . .	94
<b>Struktura i właściwości czynnika transkrypcyjnego IIIA <i>Xenopus laevis</i></b> Structure and properties of transcription factors IIIA from <i>Xenopus laevis</i> ELIZA WYSZKO, MIROŚŁAWA BARCISZEWSKA . . . . .	102
<b>Szukanie igły w stogu siana. Identyfikacja genów ulegających różnicowej ekspresji</b> Looking for a needle in a haystack. Identification of differentially expressed genes MICHAŁ DĄBROWSKI . . . . .	110
<b>Regulacja syntezy cząsteczki fibrynogenu</b> Regulation of fibrinogen molecule synthesis ELŻBIETA PLUSKOTA, CZESŁAW S. CIERNIEWSKI . . . . .	115
<b>Białka mozaikowe</b> Mosaic proteins IWONA ŻAK . . . . .	120
<b>Flipazy — białka transportujące fosfolipidy</b> Flipases — phospholipid transporting proteins ŁUKASZ PUŁASKI . . . . .	131
<b>Glikozoaminoglikany — struktura i funkcja</b> Glicosaminoglycans — structure and function ANDRZEJ GŁOWACKI, EWA MARIA KOŹMA, KRYSZYNA OLCZYK, EUGENIUSZ J. KUCHARZ . . . . .	139
<b>Molekularna organizacja komórki, t. II. Lipidy, liposomy i błony biologiczne — skrypt do ćwiczeń — recenzja</b> ARKADIUSZ KOZUBEK, ALEKSANDER F. SIKORSKI, JAN SZOPA . . . . .	149
<b>Sprawozdanie z działalności Polskiego Towarzystwa Biochemicznego</b> . . . . .	151

## Profesor Stanisław Marian Józkiwicz Wspomnienia



1910-1994

W dniu 19 grudnia 1994 roku, w kilkanaście dni po swoich 84 urodzinach, zmarł współtwórca Wydziału Lekarskiego w Katowicach oraz Wydziału Farmaceutycznego w Sosnowcu, doktor honorowy AM w Katowicach, profesor Stanisław Marian Józkiwicz.

Profesor Józkiwicz urodził się 8 grudnia 1910 roku we Lwowie. Po ukończeniu w rodzinnym mieście V Gimnazjum im. Jana Karola Chodkiewicza, odbył też tam w latach 1928-1935, studia na Wydziale Matematyczno-Przyrodniczym Uniwersytetu Jana Kazimierza. Już w okresie studiów pracował jako asystent w Katedrze Chemii Ogólnej pod kierunkiem profesora Kazimierza Tołłoczki. Pracę magisterską wykonał pod kierunkiem profesora Romana Małachowskiego w Katedrze Chemii Organicznej. Po studiach podjął pracę w Oddziale Wodnym Lwowskiej Filii Państwowego Zakładu Higieny, którym kierował w latach 1937-1941. Po wybuchu wojny niemiecko-sowieckiej przeniósł się do Krakowa, gdzie pracował w Instytucie Badań nad Tyfusem Plamistym, pod kierunkiem profesora Rudolfa Weigla, a później w Wytwórni Surowic i Szczepionek pod kierunkiem profesora Odonu Bujwida. Po zakończeniu działań wojennych w marcu 1945 roku, pierwszym transportem, przybywa do dymiącego jeszcze Wrocławia. Był jednym z organizatorów szkolnictwa wyższego we Wrocławiu. Rozpoczął pracę w Katedrze Chemii Fizjologicznej Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu i Politechniki Wrocławskiej. W 1951 roku uzyskał doktorat z nauk przyrodniczych promowany przez profesora Tadeusza

Baranowskiego. W tym samym roku przybywa na Śląsk, gdzie organizuje Katedrę Chemii Fizjologicznej Śląskiej Akademii Medycznej w Zabrze-Rokitnicy. W katedrze tej był kolejno zastępcą profesora (1951-1954), docentem (1955-1961), a od 1961 roku profesorem nadzwyczajnym i zwyczajnym.

Profesor Stanisław Józkiwicz był inspiratorem i opiekunem 7 prac habilitacyjnych następujących osób: Kazimierza Spetta (1960), Tadeusza Jerzykowskiego (1966), późniejszego kierownika Katedry Toksykologii Wydziału Farmaceutycznego w Sosnowcu, Józefa Stanoska (1967), swego następcy w Katedrze w Zabrze-Rokitnicy, Anny Tokarzowej (1968), późniejszego pierwszego kierownika Katedry Biochemii Wydziału Lekarskiego w Katowicach-Ligocie, Janusza Gregorczyka (1971), późniejszego kierownika Katedry Biochemii AM w Szczecinie, Zdzisławy Elbowicz-Waniewskiej (1973), potem kierownika Katedry Chemii i Analizy Leków Wydziału Farmaceutycznego w Sosnowcu i Mariana Drożdża (1979), organizatora i długoletniego Dziekana Wydziału Farmaceutycznego w Sosnowcu, oraz długoletniego kierownika Katedry Diagnostyki Laboratoryjnej i Chemii Klinicznej tego Wydziału. Długa jest lista Jego doktorantów, spośród nich aż dziewięciu zostało samodzielnymi pracownikami nauki. Z okresu kierowania Katedrą Chemii Fizjologicznej Wydziału Lekarskiego w Zabrze-Rokitnicy pochodzi większość dorobku naukowego Profesora, obszernego, bo liczącego ponad 100 publikacji. Jego badania dotyczyły wpływu specyficznych i niespecyficznych bodźców stresowych (ultradźwięki, hałas, wibracje, glikokortykosterydy) na metabolizm, oraz wybranych zagadnień toksykologii przemysłowej i biochemii klinicznej. Profesor był autorem wielokrotnie wznawianego skryptu noszącego tytuł „Chemia fizjologiczna”, którego pierwsze wydanie ukazało się w 1954 roku. Znaczenia tego skryptu nie można oceniać z dzisiejszej perspektywy, przy ogromnej dostępności różnorodnych, krajowych i obcych wydawnictw biochemicznych w księgarniach. Były to lata „żelaznej kurtyny”. Dopływ informacji naukowych z zachodu był ograniczony. Po 22 latach kierowania Katedrą, w 1973 roku, w wyniku reorganizacji Profesor został zmuszony do odejścia z Katedry. Kierownikiem Katedry Chemii Fizjologicznej został jego wychowanek, docent Józef Stanosek.

W latach 1973-1981 był profesorem w Katedrze Chemii Klinicznej i Diagnostyki Laboratoryjnej Wydziału Farmaceutycznego Śląskiej Akademii Medycznej, którą kierował wówczas profesor Marian Drożdż. Był to okres niezwykle owocny, nie waham się powiedzieć, że wywarł On ogromny wpływ na pierwsze kilkanaście lat działalności Wydziału Farmaceutycznego w Sosnowcu. To głównie dzięki ogromnemu autorytetowi Profesora i Jego poparciu w 1971 roku został erygowany Wydział Farmaceutyczny w Sosnowcu. Gdy w 1982 roku zmarła doc. Tokarzowa kierownictwo Katedry Biochemii Wydziału Lekars-

kiego w Katowicach-Ligocie zostało powierzone prof. M. Drożdżowi. Od pierwszych tygodni kierowania Katedrą, profesor Dróżdż zatrudnił w Katedrze Profesora Stanisława Józkiwicza. Profesor pracował w tej Katedrze do końca swych dni, ostatnie lata w wymiarze pół etatu. Profesor Stanisław Józkiwicz, doktor honorowy Uczelni, dzięki swemu spokojowi i ogromnemu urokowi osobistemu cieszył się szacunkiem i sympatią wszystkich współpracowników.

Profesor Stanisław Józkiwicz był założycielem i pierwszym prezesem Oddziału Śląskiego Polskiego Towarzystwa Biochemicznego (1964-1966). Był organizatorem XI Zjazdu tego towarzystwa (Katowice 1971). Był członkiem Polskiego Towarzystwa Fizjologicznego, a w 1987 roku otrzymał honorowe członkostwo Polskiego Towarzystwa Fizjologicznego. W roku 1982 uczelnia, w której przepracował więk-

szość swego twórczego życia, Śląska Akademia Medyczna nadała Mu tytuł doktora honoris causa. Promotorem w tym uroczystym przewodzie doktorskim był profesor Zbigniew Stanisław Herman.

Profesor Stanisław Józkiwicz dużą uwagę przywiązywał nie tylko do umiejętności naukowych, lecz i do tzw. „zachowania akademickiego” swoich wychowanków. Bardzo przeżywał zarówno sukcesy jak i porażki swych wychowanków. Profesor uważał, że nauka jest chyba ostatnią dziedziną w której znaczenie ma mistrz, pod kierunkiem którego zdobywa się kolejne stopnie naukowe. Sam był uczniem profesora Romana Małachowskiego — ucznia profesora Jakuba Karola Parnasa. Profesor Stanisław Marian Józkiwicz odszedł spokojnie, otoczony szacunkiem i wdzięcznością swych uczniów — dla nich będzie zawsze niezastąpiony.

*Uczniowie i współpracownicy*

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

## **PROGRAM NAUKOWY ZJAZDU:**

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

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

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

Doc. dr hab. Katarzyna NAŁĘCZ,

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

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

# Regulacja cyklu komórkowego — udział białkowych inhibitorów kinaz cyklino-zależnych

## Regulation of cell cycle — involvement of protein inhibitors of cyclin-dependent kinases

BARBARA GRZELAKOWSKA-SZTABERT\*

### Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Kinazy cyklino-zależne i ich wewnątrzkomórkowe kompleksy
  - II-1. Kinazy cdk i ich kompleksy z cyklinami
  - II-2. Wieloskładnikowe kompleksy kinaz cdk z białkami komórkowymi
- III. Inhibitor p21 i kodujący go gen *PIC1*
  - III-1. Gen *PIC1* i regulacja jego ekspresji
  - III-2. Oddziaływania białka p21 z kinazami cdk i ich fizjologiczne znaczenie
- IV. Inhibitor p27 i kodujący go gen *KIP1*
  - IV-1. Transkrypt genu *KIP1* i białko p27
  - IV-2. Interakcja białka p27 z kinazami cdk i jej metaboliczne konsekwencje
- V. Inhibitory p16 i p15 i kodujące je geny *MTS1/INK4A* i *MTS2/INK4B*
  - V-1. Białko p16 jako inhibitor kinaz cdk4 i cdk6
  - V-2. Gen *MTS1*, kodujący inhibitor p16, jako prawdopodobny gen supresorowy
  - V-3. Białko p15 kodowane przez gen *MTS2/INK4B* działa jako efektor antymitogenu TGF- $\beta$ 1
- VI. Syntetyczne inhibitory kinaz cdk
  - VI-1. Pochodne purynowe
  - VI-2. Butyrolakton I
  - VI-3. Pochodne flawinowe
  - VI-4. Pochodne fumagiliny
  - VI-5. Staurosporyna
- VII. Podsumowanie

### Contents:

- I. Introduction
- II. Cyclin-dependent kinases and their intracellular complexes
  - II-1. cdk kinases and their complexes with cyclins
  - II-2. Multicomponent complexes of cdk kinases with cellular proteins
- III. Inhibitor p21 and its gene *PIC1*
  - III-1. Gene *PIC1* and regulation of its expression
  - III-2. Interaction of p21 with cdk kinases and its physiological role
- IV. Inhibitor p27 and its gene *KIP1*
  - IV-1. Transcript of *KIP1* and protein p27
  - IV-2. Interactions of inhibitor p27 with cdk kinases and their metabolic consequences
- V. Inhibitors p16 and p15 and their genes *MTS1/INK4A* and *MTS2/INK4B*
  - V-1. p16 as inhibitor of cdk4 and cdk6 kinases
  - V-2. Gene *MTS1*, as putative suppressor gene
  - V-3. Protein p15, coded by *MTS2/INK4B* gene, acts as effector of transforming factor TGF- $\beta$ 1
- VI. Synthetic inhibitors of cdk kinases
  - VI-1. Purine derivatives
  - VI-2. Butyrolaktone I
  - VI-3. Flavin derivatives
  - VI-4. Fumagillin derivatives
  - VI-5. Staurosporine
- VII. Conclusions

**Wykaz stosowanych skrótów:** PCNA — jądrowy antygen proliferujących komórek; kinazy cdk — kinazy cyklino-zależne; kinazy MAP — kinazy aktywowane działaniem mitogenu; Cln — cykliny znajdujące w fazie G1 komórek drożdży; Clb — cykliny znajdujące w fazach G2 i M komórek drożdży.

### I. Wstęp

Przechodzenie komórek eukariotycznych przez cykl komórkowy jest złożonym procesem regulowanym

przez liczne czynniki zewnątrz- i wewnątrzkomórkowe, odpowiedzialne za tzw. wewnętrzne punkty kontrolne cyklu (*cell-cycle checkpoints*). Po zadziałaniu czynników wzrostowych na powierzchnię komórki — i ich interakcji z odpowiednimi receptorami — ulega uruchomieniu kaskada procesów biochemicznych przenoszących sygnał mitogeny do jądra komórkowego. W jądrze komórkowym następuje skoordynowana transkrypcja genów tzw. wczesnej i późnej odpowiedzi. Ekspresja tych genów jest częścią programu genetycznego odpowiedzialnego za wyjście komórek ze stanu spoczynkowego, wywołanie w nich syntezy DNA i doprowadzenie do podziału. Istotnym elementem tego programu jest obecność wewnątrz-

\* Prof. dr hab. Zakład Biochemii Komórki, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego, PAN, Pasteura 3, 02-093 Warszawa

nych punktów kontrolnych w różnych etapach cyklu, przede wszystkim na granicy faz G1/S oraz G2/M, a także podczas mitozy przy tworzeniu wrzeciona kariokinetycznego. W tych to momentach cyklu dokonywane jest m.in. monitorowanie gotowości komórek do rozpoczęcia syntezy DNA, a następnie sprawdzenie czy została ona w pełni ukończona. Funkcją tych punktów kontrolnych jest zatem uniemożliwienie komórkom wejścia w kolejną fazę cyklu przed zakończeniem syntezy wszystkich niezbędnych makrocząsteczek [1-6].

Szczególną rolę w przejściu komórek przez te krytyczne punkty grają w komórkach eukariotycznych kinazy serynowo-treoninowe, znane jako kinazy cyklino-zależne (cdk, *cyclin-dependent kinases*) [7-18]. W komórkach drożdży *S. cerevisiae* występuje jedna kinaza, tzw. kinaza cdc2, w *S. pombe* — kinaza CDC28, w komórkach ssaków natomiast wykryto już kilkanaście kinaz cyklino-zależnych. Następująca kolejno aktywacja poszczególnych enzymów z tej rodziny i wynikająca z tego fosforylacja właściwych substratów (białek strukturalnych, enzymatycznych, regulatorowych) promuje uporządkowany przebieg cyklu komórkowego. Poznanie wewnątrzkomórkowych mechanizmów leżących u podstaw regulacji funkcjonowania kinaz cdk i ich współdziałania z produktami genów supresorowych ma również istotne znaczenie w zrozumieniu procesów prowadzących do powstania nowotworów.

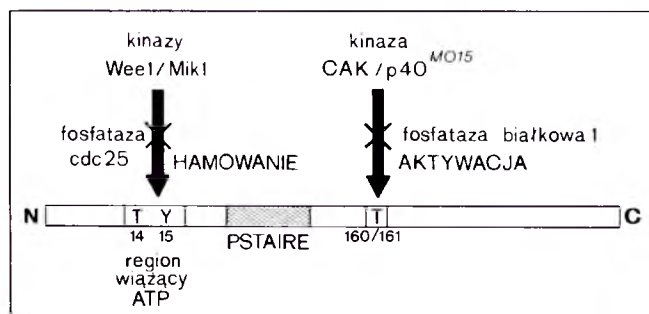
Artykuł poświęcony jest grupie wewnątrzkomórkowych białek hamujących aktywność kinaz cdk w komórkach ssaków.

## II. Kinazy cyklino-zależne i ich wewnątrzkomórkowe kompleksy

### II-1. Kinazy cdk i ich kompleksy z cyklinami

Kinazy cdk (cdk1-cdk7) są białkami o c.c.z. 32-38kD, w których liczne sekwencje aminokwasowe wykazują znaczny stopień homologii [7, 15, 18-21]. W cząsteczce kinaz cdk wyróżnia się region wiążący ATP (sekwencja GEGTYG) oraz występującą w odległości 25 AA od niego, 16-aminokwasową sekwencję — EGVSTAI-REISLLKE- (skrót PSTAIRE; Ryc. 1). Uczestniczy ona prawdopodobnie w wiązaniu kinazy cdk, stanowiącej podjednostkę katalityczną kompleksu, z cyklinami A-H, jako podjednostkami regulatorowymi [14, 22-24]. W wiązaniu wielu kinaz cdk z cyklinami bierze też udział białko p9 [25], homolog białka p13, kodowanego przez gen *sucl* u drożdży.

O aktywności enzymatycznej kompleksu kinazy cdk z cykliną decyduje fosforylacja i defosforylacja aminokwasów T14 i Y15 leżących w centrum aktywnym kinazy, oraz T160/161 i S277, znajdujących się poza nim (Ryc. 1). W tych procesach decydujących o aktywności kompleksu uczestniczą liczne, specyficznie działające kinazy (CAK, weel, mik1) i fosfatazy (cdc25).

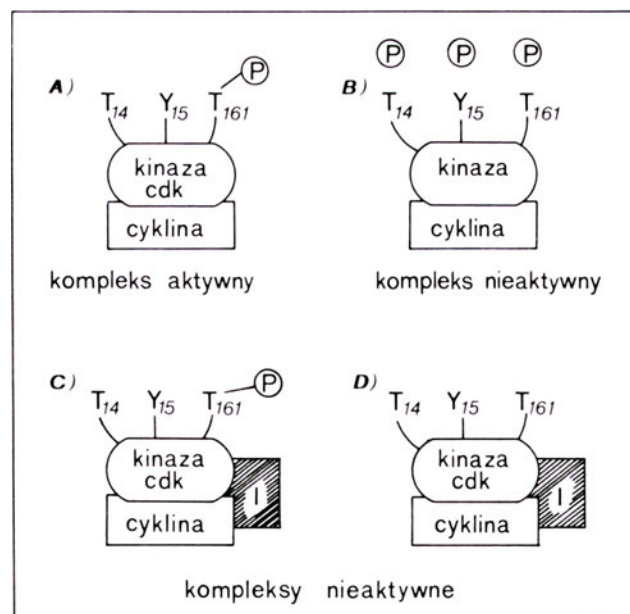


Ryc. 1. Schemat budowy kinazy cyklino-zależnej (wg 29, zmodyf.). Uwidoczniono region wiążący ATP oraz typową dla kinaz cdk sekwencję aminokwasową PSTAIRE. Zaznaczono także uczestniczące w aktywacji tego enzymu kinazy białkowe (wee1/mik1, CAK/p40<sup>M015</sup>) oraz fosfatazy (cdc25 i fosfatazę białkową I) uczestniczące w jego aktywacji i w inaktywacji.

Tego typu regulację aktywności enzymatycznej przez fosforylację i defosforylację najlepiej poznano w przypadku kinazy cdk1 (cdc2) skompleksowanej z cykliną B [9, 13, 26-28]. Przypuszcza się, że aktywność pozostałych kinaz cdk regulowana jest w podobny sposób.

W aktywnej kinazie cdk1, działającej w komórce na przełomie faz G2/M, T14 i Y15 nie są ufosforylowane, ufosforylowana zaś jest T w pozycji 161 (Ryc. 2A). W kompleksie nieaktywnym enzymatycznie wszystkie wymienione wyżej aminokwasy są ufosforylowane (Ryc. 2B). Nieaktywne enzymatycznie formy kinazy cdk mogą pojawiać się również po dołączeniu do niej wewnątrzkomórkowego białkowego inhibitora (Ryc. 2C i D; patrz rozdziały III-V).

W tabeli 1 zestawiono najczęściej występujące w komórkach ssaków kinazy cdk oraz ich typowe cyklino-podjednostki regulatorowe. Zaznaczono także,



Ryc. 2. Schematyczne przedstawienie aktywnej formy kinazy cdk (A) oraz jej form nieaktywnych zawierających ufosforylowane tyrozynę (Y) i treoninę (T) w regionie wiążącym ATP (B) lub też dodatkowo przyłączony wewnątrzkomórkowy inhibitor I (C, D). Można przypuszczać, że inhibitor może bądź to hamować aktywność kinazy z odblokowanym regionem wiązania ATP (C), bądź uniemożliwiać „aktywną” fosforylację treoniny 161 przez kinazę CAK (D).

**Tabela 1.**

Kinazy cdk w komórkach ssaków (z danych 7, 14, 15, 19, 20, 22)

Kinaza	Homologia sekwencji AA w stosunku do cdk1; %	Region PSTAIRE lub zbliżony	Wiązanie cykliny	Aktywność enzymatyczna w fazie cyklu	Wiązanie białka homologicznego do <i>suc1</i>
cdk1 (cdc2)	100	PSTAIRE	cyklina A cyklina B	S G2/M	tak
cdk2	65	PSTAIRE	cyklina A cyklina E cykliny D3 i D1	S G1/S G1	tak
cdk3	66	PSTAIRE	?	G1?	tak
cdk4	44	PV/ISVRE	cyklina D1	G1	nie
cdk5	57	PSSALRE	cykliny D inne?	G1	nie
cdk6	?	PLSTIRE	cyklina D1	G1	?
cdk7	?	?	cyklina H	?	?

w której fazie cyklu komórkowego enzymy te przejawiają najwyższą aktywność. Jak widać poszczególne kinazy cdk różnią się powinowactwem wobec określonych cyklin należących do różnych grup. Niektóre z kinaz, tak jak kinaza cdk4, łączą się tylko z jednym partnerem cyklinowym, inne, jak kinaza cdk2 aktywowane są przez cykliny tzw. mitotyczne (A, B) oraz cykliny typowe dla fazy G1. Należy zaznaczyć, że każdy z takich kompleksów czynny jest w innej fazie cyklu komórkowego. Jak dotąd nie znaleziono cyklinowego partnera kinazy cdk3, przypuszcza się jednak, że kinaza ta jest aktywowana przez cyklinę(y) i jest niezbędna dla prawidłowego przebiegu fazy S [15].

Kompleksy kinaz cdk z cyklinami są nietrwałe (*transient*), może też w nich zachodzić wymiana partnerów. Na krótkotrwałą stabilność tych kompleksów mają niewątpliwie wpływ różnice w czasie półtrwania cyklin i kinaz cdk. Jest on na przykład rzędu minut (30') w przypadku cykliny D i rzędu godzin (4h) w przypadku kinazy cdk [22]. Nie można też wykluczyć znaczenia różnych potranslacyjnych modyfikacji białek tworzących podjednostki, czy też współdziałania podjednostek z innymi niezidentyfikowanymi dotąd białkami komórkowymi.

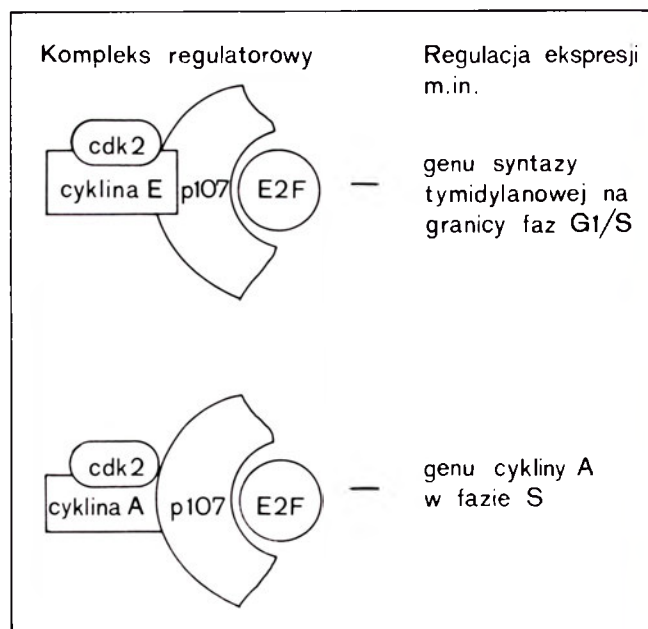
Tak więc prawidłowości leżące u podstaw interakcji kinaz cdk z cyklinami są bardzo złożone i jeszcze nie dostatecznie wyjaśnione. Należy sądzić, że poznana niedawno struktura krystaliczna jednej z kinaz (cdk2), ułatwi zrozumienie powyższych zależności [29, 30].

## I-2. Wieloskładnikowe kompleksy kinaz cdk z białkami komórkowymi

Od 1992 r. wiadomo, że kinazy cdk oprócz połączeń z cyklinami tworzą kompleksy z innymi jeszcze białkami komórkowymi. Niektóre z kinaz cdk, zwłaszcza kinazę cdk2, wykrywa się w kompleksach zawierających oprócz cykliny A lub cykliny E także czynnik

transkrypcyjny E2F oraz białko p107, pokrewne produktowi genu supresorowego *Rb* [31-32]. Formowanie się takich kompleksów (różniących się obecnością określonej cykliny) stwierdzono w komórkach będących w różnych fazach cyklu komórkowego: kompleksy z cykliną E w fazie G1, z cykliną A w fazie S. Niewątpliwie, dzięki interakcji z czynnikiem transkrypcyjnym E2F i białkiem o właściwościach supresorowych, kinaza cdk2 może pośrednio wpływać na ekspresję różnych genów (Ryc. 3).

Wiadomo już, że prawie wszystkie kinazy cdk (oprócz cdk3) obecne w prawidłowych komórkach ssaków występują w postaci czteroskładnikowych kompleksów zawierających oprócz kinazy, jako podjednostki katalitycznej, także jedną z cyklin z grupy A, B, D lub E oraz białka p36 i p21 [33-37]. Obecność białek p36 i p21 w kompleksach zawierających różne



Ryc. 3. Przykłady aktywnych kompleksów kinazy cdk2 z białkami komórkowymi.



cykliny sugeruje, że mogą one grać jednakową rolę, istotną dla funkcjonowania wszystkich kompleksów kinazowych [36]. Okazało się także, że komórki stransformowane zawierają tylko dwuskładnikowe kompleksy kinaz cdk z cyklinami. Znajdowane są w nich również połączenia kinaz cdk z innymi białkami np. kinazy cdk4 jedynie z białkiem p16 (patrz rozdz. V) [35]. Dwuskładnikowe kompleksy kinaz cdk i cyklin występują też w komórkach nie zawierających produktu genu supresorowego *p53* i pochodzące od pacjentów z zespołem Li-Fraumeni [35].

Białko p36 zidentyfikowano jako jądrowy antygen proliferujących komórek (PCNA), o którym wiadomo, że uczestniczy zarówno w replikacji jak i reparaacji DNA [38, 39]. Jego funkcja w kompleksach z kinazami cdk i innymi białkami wydaje się bardzo złożona. Podejrzewa się np., że PCNA może być elementem odbierającym sygnały ("sensor") o uszkodzeniach DNA czy zmieniających się warunkach wzrostu. Stwierdzono też ostatnio bezpośrednie oddziaływanie PCNA z białkiem p21 (patrz rozdział III.2). Wnioskuje się natomiast, że PCNA nie uczestniczy w wiązaniu p21 z kinazami cdk i cyklinami, gdyż uzyskano *in vitro* trójskładnikowe kompleksy nie zawierające PCNA [34].

Białko p21 okazało się być fizjologicznym inhibitorem wszystkich poznanych dotąd kinaz cdk [34]. Pogląd zatem mówiący, że o aktywności enzymatycznej kompleksu kinaza cdk-cykлина decyduje przede wszystkim stopień ufosforylowania jego podjednostek, zwłaszcza kinazy cdk, musi ulec modyfikacji. Białko p21 należy do coraz liczniejszej klasy zidentyfikowanych białkowych inhibitorów kinaz cdk [40-44]. Takie inhibitory białkowe określa się też jako negatywne regulatory wzrostu komórek [45].

### III. Inhibitor p21 i kodujący go gen *PIC1*

Białko p21 jest w ostatnich dwóch latach jednym z najintensywniej badanych regulatorów wzrostu komórek. Zostało wykryte niezależnie w kilku laboratoriach z zastosowaniem bardzo różnych podejść eksperymentalnych. W związku z tym białko p21 znane jest pod różnymi nazwami: CIP (*cdk-interacting protein*) [46], WAF-1 (*wild-type p53 activated fragment*) [47], SDI-1, (*senescent cell derived inhibitor*) [48] czy też CAP 20 (*cdk-2-associated protein*) [49]. Sugeruje się także, ażeby gen kodujący białko p21 nosił nazwę *PIC1* (*p53-regulatory inhibitor of cells*) [1, 40], ze względu na istotne jego powiązania z genem supresorowym *p53*. Nazwę *PIC1* stosować będę w dalszej części artykułu.

#### III-1. Gen *PIC1* i regulacja jego ekspresji

Gen *PIC1* znajduje się w komórkach mysich w chromosomie 17, proksymalnie w stosunku do genu kodującego histon H2 [50]. Z porównania sekwencji nukleotydowych w genie *PIC1* z komórek aż 17 mysich

szczepów [50] oraz 20 różnych ludzkich komórek nowotworowych [51] wynika, że geny te są genami homologicznymi, w których kodony 21-60 oraz 131-164 wykazują szczególnie wysoką konserwatywność. Jedyną, bardzo rzadko występującą, mutację znaleziono w kodonie 31 genu *PIC1* (kodowanie argininy zamiast seryny). Zmutowane białko p21 (p21-A) cechują jednak te same właściwości co białko macierzyste (p21-S) [50, 51].

Ekspresja genu *PIC1* zmienia się podczas cyklu komórkowego [52]. Ilość *PIC1* mRNA wzrasta wyraźnie w fazie G1 (po zastymulowaniu komórek do wzrostu, np. surowicą), obniża w komórkach wkraczających w fazę S i osiąga najniższy poziom w komórkach w późnej fazie S. Pewien wzrost ilości *PIC1* mRNA stwierdza się również w komórkach znajdujących się w fazach G2 i M, co sugeruje, że białko p21 może funkcjonować i w tych fazach cyklu komórkowego.

Intryguje pytanie, jaki jest mechanizm regulujący zmienną ekspresję genu *PIC1* w czasie cyklu komórkowego. Głównym czynnikiem indukującym ekspresję *PIC1* jest, jak się sądzi, białko p53, produkt genu supresorowego *p53* [47, 53-55]. W komórkach traktowanych czynnikami uszkodzającymi DNA wzrasta bowiem znacząco poziom prawidłowego białka p53, jak też i białka p21. Czynniki uszkodzające DNA nie wywierały natomiast wpływu na poziom białka p21 w komórkach zawierających zmutowany gen *p53* [53]. Akumulację p21 wykrywano także w komórkach z nadekspresją genu *p53*, które w związku z tym przestały się dzielić i zostały zatrzymane w fazie G1, lub ulegały apoptozie w szlaku obejmującym białko p53 [53, 54, 56-58]. Dalszych dowodów przemawiających za udziałem białka p53 w regulacji ekspresji genu *PIC1* dostarczyły badania fibroblastów pochodzących od pacjentów z zespołem Li-Fraumeni, zawierających tylko jedną kopię prawidłowego genu *p53* lub nawet niezawierających jej wcale. Analizując poziom *PIC1* mRNA w tych komórkach wykazano, że pojedyncza kopia genu *p53* wystarcza do uaktywnienia transkrypcji genu *PIC1*; utrata obydwu kopii genu *p53* prowadziła do spadku ekspresji genu *PIC1* i w efekcie do osłabienia syntezy białka p21 [37, 52].

Jak już wspomniano powyżej (r. III), w komórkach niezawierających genu *p53* obecne są tylko dwuskładnikowe kompleksy kinaz cdk z cyklinami, chociaż wewnątrzkomórkowy poziom trzeciego składnika, PCNA, pozostaje zasadniczo bez zmian. Wskazuje to pośrednio na udział białka p21 w wiązaniu jądrowego antygeny proliferujących komórek z pozostałymi składnikami kompleksu kinaza cdk-cykлина [37-52].

Stymulację ekspresji genu *PIC1*, w komórkach (niezależnie od obecności lub nieobecności genu *p53*) wywołują też liczne czynniki indukujące różnicowanie komórek, np. TPA, DSMO czy kwas retinowy [59, 60]. Wzrostowi wewnątrzkomórkowego poziomu białka p21, produktu genu *PIC1*, towarzyszy wówczas ob-

nizienie stopnia ufosforylowania białka p105 (produktu genu supresorowego *Rb*) i zatrzymanie komórek w fazie G1 oraz rozpoczęcie ich różnicowania [37, 52].

Różne czynniki mitogenne — surowica oraz czynniki wzrostowe (plytkowy, naskórkowy czy fibroblasyczny) mogą również stymulować ekspresję genu *PIC1* [54, 61]. Obserwuje się pozorny paradoks, gdyż przejściowemu wzrostowi wewnątrzkomórkowego poziomu białka p21 nie towarzyszy zatrzymanie podziału komórek. Co więcej wykryto, tak *in vivo* jak i *in vitro*, obecność białka p21 w kompleksach zarówno z aktywnymi enzymatycznie jak i nieaktywnymi kinazami cdk [37, 52]. Jak więc pogodzić te obserwacje z faktem, że p21 okazał się być inhibitorem aktywności wszystkich przebadanych kinaz cdk [46, 34, 62], lecz nie hamował działania innych kinaz białkowych [46]. Hamowanie kinaz cdk jest bardzo wyraźne, a wartość  $K_i$  p21, oznaczona w badaniach *in vitro* z użyciem oczyszczonych kompleksów kinaz cdk z cyklinami, jest rzędu 8-10 nM [46].

### III-2. Oddziaływania białka p21 z kinazami cdk i ich fizjologiczne znaczenie

Wysnuto przypuszczenie, że kompleksy kinaz cdk aktywne i nieaktywne enzymatycznie, różnią się liczbą związanych cząsteczek białka p21. Formy aktywne miałyby zawierać w kompleksie tylko jedną cząsteczkę p21, zaś nieaktywne — wiele cząsteczek p21 [37], których liczba mogłaby nawet przekraczać liczbę podjednostek kinazy cdk i odpowiedniej cykliny [61]. Zgodny z tą hipotezą jest, obserwowany *in vitro*, gwałtowny spadek aktywności enzymu po dodaniu białka p21 [34]. Dotyczy to wszystkich kinaz cdk, niezależnie od tego, w której fazie cyklu działają.

*In vivo* sytuacja musi być bardziej złożona, gdyż oprócz ilościowych zmian poszczególnych składników kompleksu, mogą one, zwłaszcza kinazy cdk, ulegać istotnym potranslacyjnym modyfikacjom. Modyfikacją taką jest przede wszystkim fosforylacja kilku reszt aminokwasowych (rozdział V). Wysłuszenie kompleksu przez p21 może też blokować dostęp specyficznych kinaz CAK (patrz rozdz. II), fosforylujących T161 w kinazie cdk [37]. Nadal przedmiotem badań jest kwestia, czy w komórce p21 wiąże się z już ufosforylowaną czy też nieufosforylowaną podjednostką cdk.

Postuluje się także, że białko p21 mogłoby grać rolę czynnika promującego łączenie się kinaz cdk z cyklinami ("assembly factor"). Przemawia za tym sposobem działania, między innymi, kilkukrotny wzrost aktywności kinazowej po dodaniu niewielkich ilości p21 do lizatów komórkowych zawierających kinazę cdk2 i cyklinę A [37].

Nie można też wykluczyć możliwości, że *in vivo* mogą w grę wchodzić inne jeszcze białka komórkowe modulujące samo białko p21 i że oddziaływania te mogą być „obustronne”. Jednym z takich białek wydaje się być PCNA. Wykazano bowiem, że p21 hamuje

w układzie *in vitro* replikację DNA w wyniku bezpośredniego związania PCNA [63-67], nie wpływa natomiast na udział PCNA w reperacji DNA [64-66]. Przypuszcza się, że sposób w jaki zadziała p21 — poprzez blokowanie aktywności kinaz cdk, czy też przez hamowanie replikacji DNA, dzięki interakcji z DNA — zależy od momentu, w którym nastąpi uszkodzenie DNA. Jeśli wystąpi ono stosunkowo wcześniej, przed rozpoczęciem fazy S, to wówczas p21 miałoby działać jako inhibitor kinaz cdk. Gdy zaś uszkodzenie DNA nastąpiłoby podczas fazy S, to p21, wiążąc się z PCNA, blokowałoby replikację DNA. Dzięki oddziaływaniu bądź to z kinazami cdk, bądź też z PCNA, p21 stanowiłoby „łącznik” koordynujący mechanizmy regulacyjne cyklu komórkowego i replikacji DNA [63]. W związku z powyższym nasuwają się pytania, dziś jeszcze pozostające bez odpowiedzi: jak jest możliwe, że p21 wiąże się z tak różnymi białkami jak kinazy cdk i PCNA; w jaki sposób następuje inaktywacja białka p21 po ukończeniu replikacji DNA, czy jest ono degradowane przy udziale ubikwityny i proteasomu?

Przytoczone dane wskazują, że p21 może działać jako efektywny inhibitor przejścia komórek zwłaszcza przez wczesne fazy cyklu komórkowego, dzięki blokowaniu aktywności kinaz cdk i replikacji DNA. Wywołane eksperymentalnie podwyższenie wewnątrzkomórkowego poziomu białka p21 rzeczywiście prowadzi do zahamowania wzrostu komórek [47, 46, 34]. Nie podejmują one wówczas syntezy DNA, a w konsekwencji spada liczba komórek będących w fazie S. Efekt ten może znieść transfekcja komórek, antygenem T wirusa SV40, wywołująca rozbitcie kompleksu kinaz cdk z p21 (rozdział II.2).

### IV. Inhibitor p27 i kodujący go gen *KIP1*

Pokrewne inhibitorowi p21 wydaje się być białko p27, kodowane przez gen *KIP1* i pojawiające się w komórkach traktowanych różnymi egzogennymi czynnikami antymitotycznymi. Należy do nich przede wszystkim parakryny czynnik wzrostowy TGF- $\beta$ 1 hamujący cykl podziałowy (w fazie G1) większości komórek epi- i endotelialnych, myeloidalnych i limfoidalnych [68, 69], a także lowastatyna, inhibitor reduktazy 3-metylo-glutarylo-koenzymu A [70] oraz cAMP i rapamycyna [71].

#### IV-1. Transkrypt genu *KIP1* i białko p27

Obecność transkryptu genu *KIP1*-mRNA liczącego 2.5kb, wykrywa się we wszystkich narządach myszy. Jego poziom w dzielących się i spoczynkowych (wskutek zahamowania kontaktowego) keratynocytach jest jednakowy. Co więcej, ani stymulacja tych komórek do podziału działaniem surowicy, ani też potraktowanie komórek TGF- $\beta$ 1 nie zmieniało w nich poziomu *KIP1* mRNA. Dane te sugerują, że regulacje aktywności (i poziomu?) białka p27 mogą być regulacjami potrans-

lacyjnymi [72, 73]. W ludzkich limfocytach T wykazano jednak regulację transkrypcji genu *KIP1*, a mianowicie jej hamowanie, przez interleukinę 2 [74, 75].

Białko p27 w komórkach ludzkich i mysich składa się z około 200 AA, a sekwencje aminokwasowe wykazują aż 90% identyczności. Fragment cząsteczki p27, obejmujący 60 aminokwasów od N-końca (17-77 AA), jest w 44% homologiczny z odpowiednim fragmentem w cząsteczce omawianego już inhibitora p21 [72-73]. Białko p27 jest białkiem termostabilnym, występującym w dzielących się komórkach w kompleksie z termolabilnym, bliżej jeszcze nie określonym białkiem, które maskuje jego aktywność [72]. Wyszukane są sugestie, że może nim być kinaza *cdk4* w kompleksie z cykliną D.

#### IV-2. Interakcja białka p27 z kinazami *cdk* i jej metaboliczne konsekwencje

Białko p27 wiąże się *in vivo* z kompleksami kinaza *cdk2*-cyklina E, oraz kinaza *cdk4/cdk6*-cyklina D. Nie obserwowano natomiast łączenia się p27 ani z pojedynczą podjednostką kinazową, ani z cyklinową [76]. W układzie *in vitro*, białko p27 w stężeniach nanomolarnych, hamowało aktywność enzymatyczną powyższych kompleksów kinazowych, dopiero zaś w wyższych stężeniach aktywność kinazy *cdk1*-cyklina B, aktywnej w późniejszych etapach cyklu. Do wystąpienia aktywności inhibitorowej p27 wystarcza 52-aminokwasowa sekwencja występująca we fragmencie homologicznym z fragmentem inhibitora p21 [76].

Przypuszcza się, że hamowanie aktywności kinaz *cdk* po związaniu p27, może wynikać z wywoływanych przez to białko zmian konformacyjnych wokół centrum katalicznego kinazy. Równie istotne znaczenie miałyby mieć uniemożliwienie, po związaniu p27, fosforylacji T161 w samej kinazie *cdk*, fosforylacji niezbędnej dla pełnej aktywności enzymatycznej [77] (patrz rozdział II). *In vivo* jest również niewątpliwie ważne obniżenie przez TGF- $\beta$ 1 ekspresji genów kodujących syntezę podstawowych składników kompleksu — niektórych kinaz *cdk* (*cdk1*, *cdk4*), [78, 79], oraz cykliny A [80] i cykliny E [81, 82], będących podjednostkami regulatorowymi w kompleksie z kinazą *cdk2*. Im więcej bowiem w komórkach np. kinazy *cdk4* i cykliny D, tym więcej białka p27 zostaje niezwiązane w kompleksie. Wolne białko p27 może wówczas hamować działanie innych kinaz *cdk*, także fosforylujących białko p105, produkt genu supresorowego *Rb* [83-86]. W rezultacie, białko p105 będąc w formie nieufosforylowanej (lub słabo ufosforylowanej) [87, 88] wiąże się trwale z czynnikiem transkrypcyjnym E2F i unieczynnia go, co prowadzi do zahamowania ekspresji wielu genów, których produkty są niezbędne dla prawidłowego przebiegu cyklu [89-92].

Podobnymi właściwościami, co białko p27, odznacza się też białko p28 występujące w kompleksie z kinazą *cdk2* i cykliną E w ludzkich komórkach

nowotworowych HeLa, zahamowanych w fazie G1 przez lowastatynę oraz w zahamowanych „kontaktowo” ludzkich fibroblastach [93]. Oprócz białek p27/p28, ważnym efektem działania TGF- $\beta$ 1, okazało się też być indukowane przez ten czynnik białko p15. Jego działanie zostanie dokładniej omówione w rozdziale V-2.

#### V. Inhibitory p16 i p15 i kodujące je geny *MTS1/INK4A* i *MTS2/INK4B*

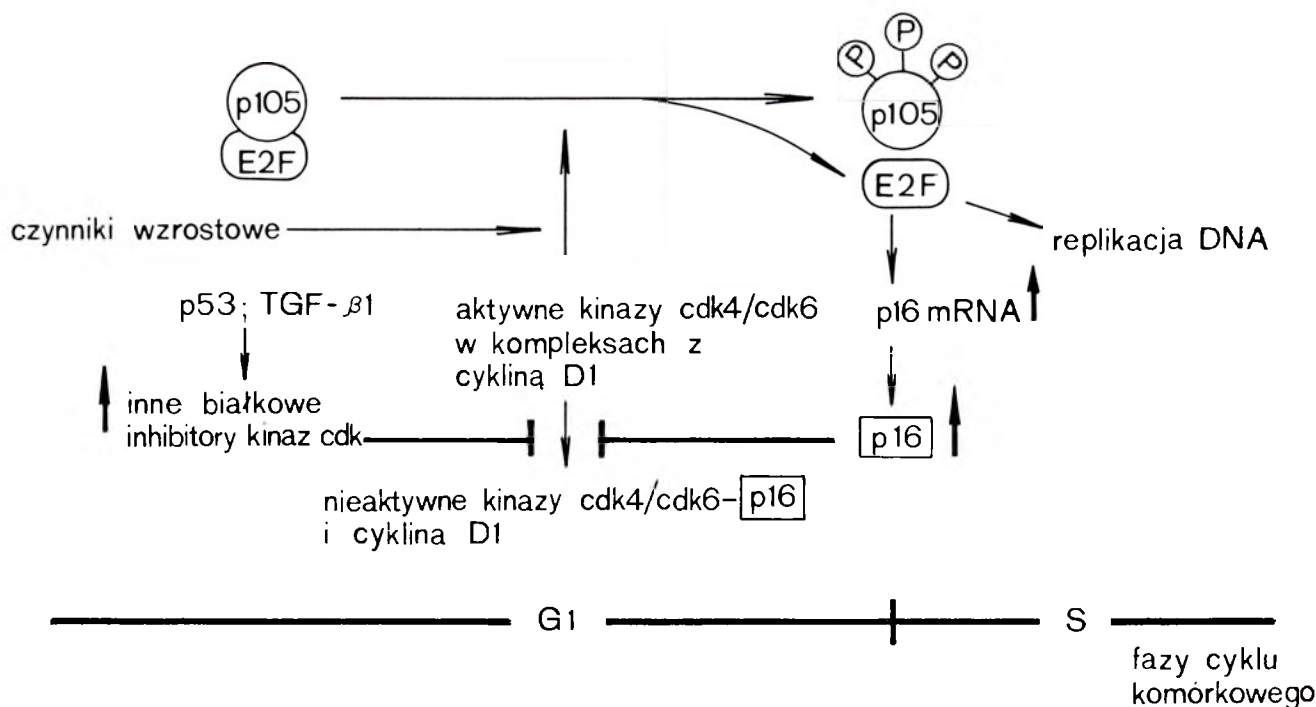
Geny kodujące białka p16 i p15 występują w chromosomie 9 człowieka, we fragmencie, który w komórkach wielu nowotworów często ulega delecji. Spowodowało to wysunięcie przypuszczenia, że produkty genów mieszczących się w tym fragmencie mogą działać hamująco na rozwój nowotworów. Geny te otrzymały w związku z tym nazwę *MTS1* i *MTS2* (*multiple tumor suppressor*) [94] (nazwywane są też *INK4A* i *INK4B*) [40]. Początkowo badania skoncentrowały się na kodowanym przez gen *MTS1* białku p16. Okazało się bowiem, że jest ono identyczne z odkrytym w 1993 r. białkiem p16 tworzącym dwuskładnikowe kompleksy z kinazą *cdk4* [95]. Takie kompleksy kinazy *cdk4* znajdowano przede wszystkim w komórkach transformowanych wirusami onkogennymi [94, 95] (patrz też rozdział II), występują one także, oprócz innych wieloskładnikowych kompleksów, w prawidłowych ludzkich fibroblastach VA13 [95].

#### V-1. Białko p16 jako inhibitor kinaz *cdk4* i *cdk6*

Białko p16, zbudowane z 360 AA, zawiera 22-aminokwasowy region wykazujący znaczną homologię z tzw. kasetą cyklinową (*cyclin box*) cyklin [96-98]. Ten N-końcowy fragment cząsteczki cyklin, odgrywa przypuszczalnie istotną rolę w wiązaniu ich z kinazami *cdk*. Mutacje w tej części cząsteczki p16 nie wywierają jednak wpływu na jego wiązanie z kinazą *cdk4* [95].

Białko p16 tworzy kompleksy przede wszystkim z kinazami *cdk4* i *cdk6*, których podjednostkami regulatorowymi są cykliny D. Nie tworzy ono natomiast połączeń z kinazami *cdk* zaangażowanymi w przebieg późniejszych niż G1 faz cyklu komórkowego [95, 99]. W przeciwieństwie do omawianych powyżej inhibitorów (rozd. III i IV), inhibitor p16 współzawodniczy z cyklinami z grupy D o wiązanie z kinazą *cdk4*. Nadekspresja genu cykliny D1, często występująca w komórkach nowotworowych [100-105], może powodować sytuację, w której nadmiar cyklin D może wypierać białko p16 z kompleksów z kinazami *cdk* i powodować ich aktywację. W rezultacie mogłaby następować fosforylacja białka p105 i/lub pokrewnych mu białek supresorowych p107 i p130, ich oddysocjowanie od czynnika transkrypcyjnego E2F, a więc tym samym uaktywnienie transkrypcji przebiegającej przy udziale E2F.

Funkcjonalny związek pomiędzy białkiem p16, ki-



**Ryc. 4.** Schemat funkcjonalnych powiązań białka supresorowego p105, kinaz cdk4/cdk6 i cyklina D1 z inhibitorem p16 (w oparciu o 106, 108). Kompleksy kinaz cdk4/cdk6 z cykliną D1 fosforylują białko p105 znajdujące się w kompleksie z czynnikiem transkrypcyjnym E2F. W efekcie hyperfosforylowane białko p105 oddysocjuje od czynnika transkrypcyjnego E2F, co wywołuje jego uaktywnienie. W następstwie E2F reguluje transkrypcję wielu genów, których produkty niezbędne są do replikacji DNA. Może on również stymulować transkrypcję genu *MTS1* i wywoływać wzrost poziomu (↑) p16mRNA i białka p16. Zwiększona ilość białka p16 wywołuje rozdysocjonowanie kompleksów kinaz cdk4/cdk6 z cykliną D, powstają wówczas ich nieaktywne kompleksy z białkiem p16 oraz wolna cyklina D1. Znak —| oznacza hamowanie.

nazami cdk, cyklinami D i białkowym produktem genu supresorowego *Rb* wydaje się być *in vivo* jeszcze bardziej złożony. Wskazuje na to m.in., wysoki wewnątrzkomórkowy poziom p16 [101] oraz brak kompleksów kinazy cdk z cyklinami D [107-109] w komórkach, w których nie występuje prawidłowy gen *Rb*, jak również niski poziom p16 w komórkach raka piersi charakteryzujących się obecnością prawidłowego genu supresorowego *Rb* [110]. Sugeruje się też możliwość stymulacji przez uaktywniony czynnik transkrypcyjny E2F (dzięki oddysocjowaniu hyperfosforylowanego białka p105), ekspresji genu kodującego p16 na początku fazy S, o czym miałyby świadczyć, obecny w tej fazie (co wykazano eksperymentalnie) wysoki wewnątrzkomórkowy poziom białka p16 [106] (Ryc. 4). Pojawiający się w nadmiarze inhibitor p16 mógłby hamować „niepotrzebną” już w tej fazie cyklu aktywność kinazy cdk4 i umożliwiać dzięki temu funkcjonowanie innych kinaz cdk zaangażowanych w prawidłowy przebieg fazy S [106, 108]. Przekonywujący dowód wskazujący na udział inhibitora p16 w regulacji wzrostu komórek, stanowi zahamowanie proliferacji, transformowanych onkogenem *Ha-ras* embrionalnych fibroblastów szczura, w wyniku ich transfekcji plazmidem zawierającym gen *MTS1* [104].

## V-2. Gen *MTS1*, kodujący p16, jako prawdopodobny gen supresorowy

Od momentu wykrycia p16 nie słabnie zainteresowanie nim jako prawdopodobnym białkiem supreso-

rowym, być może odpowiedzialnym za powstanie wielu nowotworów. Na podstawie analizy zmian chromosomalnych w komórkach ustalonych linii nowotworowych hodowanych *in vitro* sądzono początkowo, że delecje lub mutacje genu *MTS1* występują powszechnie [94, 111]. Uważano nawet, że częstość ich występowania może być porównywalna z częstością mutacji genu supresorowego *p53* [112]. Ostatnio pojawiły się wątpliwości, czy gen *MTS1* może być rzeczywiście „uniwersalnym” genem supresorowym [113, 114]. Chociaż bowiem delecje genu *MTS1* są bardzo częste w komórkach nowotworowych utrzymywanych w hodowli *in vitro*, to znacznie rzadziej występują one w komórkach nowotworów pierwotnych [115-119]. Częste występowanie aberracji w chromosomie 9p21 komórek w hodowli, wydaje się stanowić przejaw zmian adaptacyjnych, polegających na selekcji komórek, w których brak jest wewnątrzkomórkowych inhibitorów wzrostu, typu białkowych inhibitorów kinaz cdk.

Jednakże niektóre typy nowotworów charakteryzują się stosunkowo częstym występowaniem delecji i/lub mutacji w genie *MTS1* (np. rak przełyku [120, 121]; glejakomięsak [122-124]; białaczki i chłoniaki [125]), w innych są one jednak rzadsze (np. śródbłoniak [118]; rak pęcherza [119]; gwiaździak [126, 127]), lub wręcz sporadyczne (czerniaki [115]; nowotwory piersi [128, 129]). Natomiast wydaje się, że do wystąpienia zmian nowotworowych może przyczyniać się również znaczne zwielokrotnienie genu kodującego kinazę cdk4 [124, 128], czasami nawet jednocześnie z amplifikacją

genu *MDM2*. Gen *MDM2* koduje białka unieczynniające funkcjonowanie białka supresorowego p53 [92, 130, 131]. Z przytoczonych danych wynika, że produkt genu *MTS1*, białko p16, niewątpliwie uczestniczy w kontroli wzrostu komórek. Czy jednak jego funkcjonowanie jako supresora wzrostu nowotworów jest tak powszechne jak sugerowały pierwsze badania, okaże się w niedalekiej przyszłości.

Podjezwano także, że na krótkim ramieniu chromosomu 9 może występować inny niż *MTS1* gen supresorowy. Czy jest nim zidentyfikowany przez Kamba gen *MTS2* [94, 115, 132, 133]?

### V-3. Białko p15 kodowane przez gen *MTS2/INK4B* działa jako efektor antymitogenu TGF- $\beta$ 1

Występujący w chromosomie 9 przy genie *MTS1*, gen *MTS2* [94], wchodzi w skład większego, ostatnio zidentyfikowanego genu *INK4B* [99], kodującego białko p15. Podobnie jak białko p16, współzawodniczy ono z cyklina D o wiązanie wyłącznie z kinazami cdk4 i cdk6 i tworzy z nimi nieaktywne enzymatycznie, dwuskładnikowe kompleksy.

Strukturą swą białko p15 przypomina białko p16, a niektóre fragmenty N-końca cząsteczki wykazują aż 97% identyczności. 86 AA w C-końcu cząsteczki kodowanych jest przez sekwencje nukleotydowe wchodzące w skład genu *MTS2*. Obecność białka p15 wykazano po raz pierwszy w ludzkich keratynocytach potraktowanych omawianym już czynnikiem TGF- $\beta$ 1, który indukował w nich aż 30-krotny wzrost syntezy p15 mRNA [99]. Równoległe do wzrostu poziomu p15 mRNA (a w następstwie białka p15) następował spadek aktywności kinaz cdk4 i cdk6. Dane te sugerowały, że p15 może być indukowalnym efektem działania TGF- $\beta$ 1, współdziałającym prawdopodobnie z białkiem p27, kodowanym przez *KIP1*, którego ekspresja nie jest stymulowana przez TGF- $\beta$ 1.

Przypuszczalny schemat funkcjonowania w komórce obydwu efektorów TGF- $\beta$ 1 przedstawiono w tabeli 2 [133]. Zakłada się, że w komórkach proliferujących występuje tylko p27 i to wyłącznie w trójskładniko-

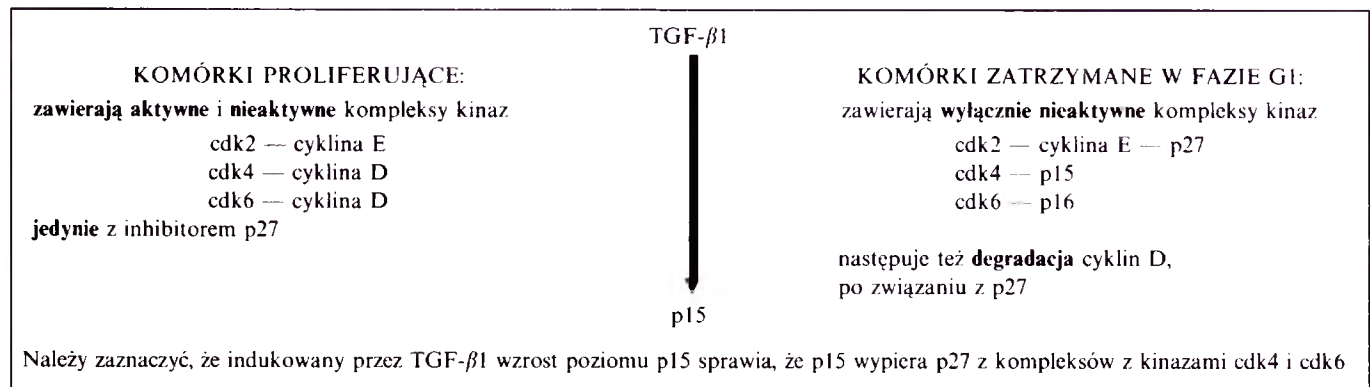
wych kompleksach kinaz cdk4/cdk6 z cyklina D i kinazy cdk 2 z cyklina E. Ilość tego inhibitorowego białka byłaby jednak niewystarczająca do unieczynnienia wszystkich obecnych w komórce kinaz powyższych rodzajów. Część kompleksów kinazowych pozostawałaby aktywna i komórki mogłyby wkraczać w fazę syntezy DNA. Po zadziałaniu na komórkę TGF- $\beta$ 1 pojawiałoby się w niej białko p15, które współzawodnicząc z cyklina D o wiązanie z kinazami cdk4/cdk6, wywoływałoby rozpad pierwotnych kompleksów i redystrybucję partnerów w kompleksie. W efekcie p27 wyparte i uwolnione z kompleksu z kinazą cdk4/cdk6 i cyklina D wiązałyby się jedynie z kinazą cdk2-cyklina E i hamowało jej aktywność, p15 zaś tworzyłoby dwuskładnikowe nieaktywne kompleksy tylko z kinazami cdk4 i cdk6. Uwolniony inhibitor p27 miałby też też wiązać się z cyklina D powodując destabilizację.

Tak więc wydaje się, że w komórkach prawidłowych można by traktować kompleks kinazy cdk4-cyklina D z białkiem p27 jako „wewnątrzkomórkowy magazyn” tego inhibitora, a kompleks kinazowy, jako wykrywany już wcześniej termolabilny składnik kompleksu [72, 76], czasowo wychwytyjący i unieczynniający białko p27. Miałoby to umożliwić funkcjonowanie kinazy cdk2 z cyklina E, niezbędne dla przejścia komórek przez punkt krytyczny na granicy faz G1/S. W sytuacji wyjątkowej, za jaką można traktować zadziałanie antymitogenu TGF- $\beta$ 1, inhibitor p27 mógłby być uwolniony z kompleksu z kinazą cdk4-cyklina D i łączyć się z kinazą cdk2 [134]. Białko p27 i p15 z pewnością nie są jedynymi efektorami działania TGF- $\beta$ 1, ale ich funkcjonowanie w regulacji wczesnych etapów cyklu komórkowego jest nie do przecenienia.

Na ogół komórki nowotworowe (np. czerniaki) nie odpowiadają na podanie TGF- $\beta$ 1 zatrzymaniem podziałów [135]. Czy wynika to z częstych delecji lub mutacji *locus* 9p21 (i genów *INK4A* i *INK4B*) występujących w komórkach utrzymywanych w hodowli, pozostaje do wyjaśnienia. Do oporności wobec TGF- $\beta$ 1 może się prawdopodobnie przyczyniać rów-

**Tabela 2.**

Schemat przypuszczalnego współdziałania inhibitorów p27 i p15 w zatrzymaniu komórek, pod wpływem czynnika transformującego TGF- $\beta$ 1, w fazie G1 cyklu komórkowego (w oparciu o 133)



niez nadekspresja cyklin z grupy D i kinazy cdk4, jako białek „wychwytyjących” inhibitor p27.

## VI. Syntetyczne inhibitory kinaz cdk

Często spotykana w komórkach nowotworowych deregulacja aktywności kinaz cdk, a także wykrycie w materiale biologicznym ich białkowych inhibitorów spowodowało poszukiwania syntetycznych związków zdolnych do specyficznego hamowania aktywności kinaz cdk. Można sobie wyobrazić, że syntetyczne inhibitory mogłyby działać poprzez:

- zakłócenie wiązania z kinazami cdk ATP i/lub ich białkowych substratów
- zaburzenie wiązania cyklin
- zakłócenia fosforylacji i defosforylacji aminokwasów decydujących o aktywności kinaz cdk
- wpływ na poziom ekspresji genów kodujących kinazy cdk i/lub cykliny
- wywoływanie zmian wewnątrzkomórkowej lokalizacji białkowych inhibitorów
- naśladowanie działania naturalnych inhibitorów

Poniżej przedstawię kilka typów inhibitorów (Ryc. 5), których działanie zostało stosunkowo najlepiej poznane.

### VI-1. Pochodne purynowe

Badania puryn, jako inhibitorów kinaz cdk rozpoczęto, gdy okazało się, że niektóre z nich (np. 6-amino-puryna) hamują podziały komórek [136, 137] i w związku z tym są stosowane w badaniach cyklu komórkowego. Porównawcze badania efektywności hamo-

wania 35 różnych kinaz białkowych, aż przez 81 pochodnych purynowych, doprowadziły do znalezienia silnego, specyficznego inhibitora kinaz cdk-olomucyny (Ryc. 5) [138].

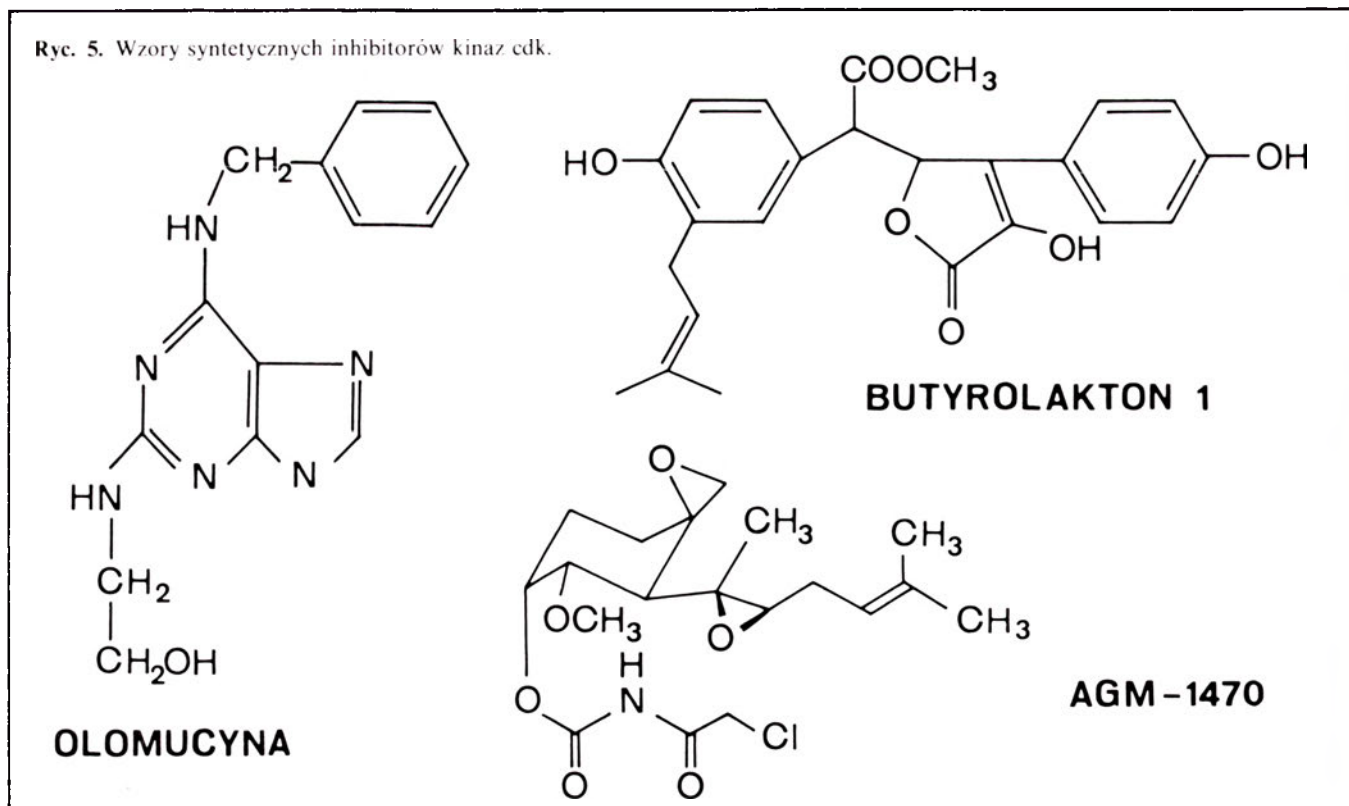
Olomucyna, w stężeniach mikromolarnych (IC 50 7-25  $\mu\text{M}$ ), hamowała aktywność kompleksów kinazy cdk1 z cykliną B, kinazy cdk2 z cykliną A i z cykliną E oraz kinaz cdk5 i MAP, a więc kinaz uczestniczących m.in. w przejściu komórek z fazy G1 w fazę S (kinaza cdk2-cyklina E), w przebieg fazy S (kinaza cdk2-cyklina A) i w przejściu z fazy G2 w mitozę (kinaza cdk1-cyklina B). Natomiast kinazy cdk4 i cdk6, działające w fazie G1 cyklu, były stosunkowo słabo hamowane przez olomucynę (IC 50 > 150  $\mu\text{M}$ ). Sądzi się, że powyższa różnica odpowiedzi poszczególnych kinaz cdk na działanie olomucyny może wynikać z różnic w strukturze przestrzennej tych białek [20, 138].

Olomucyna działa jako kompetytywny wobec ATP inhibitor kinaz cdk, niekompetytywny zaś wobec białkowego substratu, histonu H1. Efektywność olomucyny jako inhibitora kinaz cdk potwierdziły również wyniki badań *in vivo*, w których pokazano jej silne antymitotyczne działanie. Zainteresowanie olomucyną, jako specyficznym inhibitorem aktywności kinaz cdk jest duże, gdyż właśnie kinazy cdk i kinazy MAP są prawdopodobnie odpowiedzialne za hiperfosforylację białka tau w mózgu pacjentów z chorobą Alzheimera [139, 140, 16].

### VI-2. Butyrolakton I

Butyrolakton I (Ryc. 5), związek wyizolowany z grzyba *Aspergillus terreus*, hamuje aktywność kinaz

Ryc. 5. Wzory syntetycznych inhibitorów kinaz cdk.



cdk1 i cdk2 w komórkach ssaków (w stężeniach mikromolarnych), prawdopodobnie współzawodnicząc z ATP o miejsce wiązania w cząsteczce enzymu [141, 142]. Jest on także inhibitorem innych kinaz białkowych (kinaza A, C, kinazy kazeinowe, kinaza MAP), jednak w stężeniach 100-300-krotnie wyższych niż wymagane do zahamowania kinaz cdk. Prawdopodobnie właśnie w wyniku hamowania aktywności kinaz cdk2 i cdk1, butyrolakton I nie dopuszcza do inicjacji replikacji DNA w jajach *Xenopus* [143]. Zakłóca on także cykl podziałowy komórek ssaków, zatrzymując je na granicy faz G1/S lub G2/M, zależnie od momentu podania związku [141, 142]. W zatrzymanych w określonych fazach cyklu komórek, wykazano słabszą, niż w komórkach proliferujących, fosforylację białka supresorowego Rb (faza G1) oraz histonu H1 (granica faz G2/M). Potwierdza to raz jeszcze niezbędność ufosforylowania tych białek dla prawidłowego przebiegu cyklu. Sądzi się, że butyrolakton I może być związkiem pomocnym przy identyfikacji komórkowych substratów kinaz cdk.

### VI-3. Pochodne flawonowe

Złożona pochodna flawonowa L86-8275, podobnie jak butyrolakton I, może zakłócać przebieg cyklu komórkowego zatrzymując komórki bądź to w fazie G1, bądź też G2 [144]. Przyczyny tego upatruje się w obecności w komórkach nieaktywnej kinazy cdk1, nie fosforylującej wówczas histonu H1. Kinazę tę charakteryzuje niższe niż wymagane do pełnej aktywności ufosforylowanie reszt treoniny i tyrozyny. Nie wiadomo jeszcze, czy wynika to z bezpośredniej interakcji flawonu z kinazą cdk1, czy też może być rezultatem zakłócenia przez inhibitor wiązania cyklin z kinazą cdk1.

### VI-4. Pochodne fumagiliny

AGM-1470 (Ryc. 5), syntetyczna pochodna fumagiliny, związku wytwarzanego przez *Aspergillus fumigatus* [145], zatrzymuje wzrost komórek endotelialnych naczyń krwionośnych w późnej fazie G1. Przyczyną tego inhibitorowego działania AGM-1470 wydaje się być, przynajmniej częściowo, hamowanie przez ten związek ekspresji genów kodujących kinazy cdk1 oraz cykliny A i E [146, 147]. Następuje wówczas obniżenie stopnia fosforylacji białka p105 i zależnej od czynnika E2F ekspresji różnych genów i w rezultacie zahamowanie angiogenezy i wzrostu nowotworu.

### VI-5. Staurosporyna

Staurosporyna, znany inhibitor kinazy C oraz wielu innych kinaz białkowych, wykazuje zdolność zatrzymywania prawidłowych komórek w fazie G1 lub G2, zależnie od użytego stężenia [148-150]. W układzie *in vitro* staurosporyna (w stężeniach nanomolarnych),

hamuje aktywność kinaz cdk2-cyklina E, cdk2-cyklina A oraz cdk1-cyklina B [150, 151]. Są też dane sugerujące, że może ona znacząco obniżać poziom cyklin D i E *in vivo* oraz hamować aktywność kinazy (kinaz?) cdk działającej w komórkach prawidłowych będących w fazie G1, w których nie wystąpiła jeszcze aktywność kinazy cdk2-cyklina E. Wniosek ten oparto m.in. na analizie stopnia ufosforylowania białka supresorowego p105, obecnego w komórkach zatrzymanych przez staurosporynę (2nM i 20nM) w różnym czasie od rozpoczęcia fazy G1 [152].

## VII. Podsumowanie

Poznanie regulacji cyklu komórkowego polega przede wszystkim na zrozumieniu mechanizmów zapewniających funkcjonowanie właściwych kinaz cdk, połączonych z właściwymi partnerami cyklinowymi, w konkretnych momentach cyklu. O aktywności tych enzymów (lub jej braku) decydują między innymi:

- odpowiednie ilości składników kompleksów, aktywnych enzymatycznie, (tzn. kinaz cdk i cyklin) regulowane poziomem ekspresji kodujących je genów oraz intensywnością rozkładu samych białek
- właściwe modyfikacje potranslacyjne składników kompleksu, zwłaszcza fosforylacja kinaz
- obecność wewnątrzkomórkowych inhibitorów kinaz cdk, ujawniających się w odpowiedzi komórki na liczne bodźce pozakomórkowe i/lub stanowiących „wewnętrzny system kontrolny” umożliwiający komórce prawidłowy przebieg cyklu.

Wykryte w ciągu ostatnim niespełna dwóch lat i omówione w niniejszym artykule białkowe inhibitory kinaz cdk stanowią jeden z bardziej istotnych elementów regulacyjnych cyklu komórkowego. Złożone interakcje tych inhibitorów z określonymi kinazami cdk mogą bowiem powodować unieczynnianie tych enzymów w specyficznych momentach cyklu. Tłumaczyłoby to fakt, że określone białka komórkowe są fosforylowane tylko w pewnych fazach, a nie w ciągu całego cyklu komórkowego.

W tabeli 3 zestawiono, uzyskane do dziś, podstawowe informacje na temat białkowych inhibitorów obecnych w komórkach ssaków, dane o analogicznych białkach występujących w komórkach drożdży [40, 153-159]. W tabeli 3 podano też, kodowane przez gen *KAP/CIP2*, białko p24 [160, 161], przejawiające aktywność fosfatazy tyrozynowo-treoninowej i częstość traktowane jako inhibitor kinaz cdk [40]. Nie negując faktu, że białko p24 może wpływać na aktywność kinaz cdk (prawdopodobnie zmieniając stopień ich ufosforylowania), moim zdaniem traktowanie go jako inhibitora wydaje się dyskusyjne. Znany przecież wiele fosfataz, których działanie na określone białka komórkowe bądź to hamuje bądź też promuje przebieg cyklu.

**Tabela 3.**

Białkowe inhibitory kinaz cdk

Gen	Białko	Regulacja ekspresji genu	W komórkach kompleksy	Hamowanie aktywności kompleksu kinazowego	Faza cyklu	Efekty braku aktywności kinaz cdk
<i>PIC1/WAF1</i>	p21	indukcja przez czynniki uszkodzające DNA (poprzez p53), czynniki wywołujące różnicowanie, surowicę, EGF a także podczas starzenia się komórek	czteroskładnikowe: kinaza cdk — cyklina — PCNA — p21	cdk1 — cyklina B cdk2 — cyklina A cdk2 — cyklina E cdk4 — cyklina D cdk6 — cyklina E	G2/M S G1/S G1 G1	Upośledzenie fosforylacji histonu H1 (G2/M) oraz białka supresorowego p105 (G1); zatrzymanie komórek w fazie G1 i/lub G2
<i>KIP1</i>	p27	represja przez interleukinę 2	trójskładnikowe: kinaza cdk — cyklina — p27 dwuskładnikowe: cyklina — p27	cdk2 — cyklina D cdk2 — cyklina E cdk2 — cyklina A cdk4 — cyklina D cdk6 — cyklina D	G1 G1/S S G1 G1	Brak fosforylacji białka supresorowego p105; zatrzymanie komórek w fazie G1 lub na granicy G1/S
<i>MTS2/INK4B</i>	p15	indukcja przez czynnik wzrostowy TGF-β1	dwuskładnikowe: kinaza cdk — p15	cdk4 — cyklina D cdk6 — cyklina D	G1 G1	Brak fosforylacji białka supresorowego p105; zatrzymanie komórek w fazie G1
<i>MTS1/INK4A</i>	p16	wirusy onkogenne?	dwuskładnikowe: kinaza cdk — p16	cdk4 — cyklina D cdk6 — cyklina D	G1 G1	Brak fosforylacji białka supresorowego p105; zatrzymanie komórek w fazie G1
<i>KAP/CIP2</i>	p24	?	trójskładnikowe? kinaza cdk — cyklina — p24	cdk1 — cyklina B cdk2 — cyklina E cdk2 — cyklina D	G2/M G1/S G1	Zatrzymanie komórek w fazie G1
<i>Farl*</i>	p120	feromon	?	cdc28 — Cln2	G1	Zatrzymanie komórek w fazie G1
<i>Sic1*</i>	p40	?	?	cdc28 — Clb	M/G1	zaburzenia przejścia komórek z fazy M w G1
<i>Rum1*</i>	?	?	?	cdc2 — Cln?	S? G2?	zaburzenia syntezy DNA

\* Geny obecne w komórkach drożdży.

Dysponujemy dziś podstawowymi informacjami o regulacji ekspresji genów kodujących omawiane inhibitory. Brak natomiast danych o sposobach degradacji tych białek sprawiającej, że przynajmniej niektóre z nich działają tylko w określonej fazie cyklu komórkowego. Czy proteoliza tych inhibitorów przebiega z udziałem układu ubikwitynowego, podobnie jak ma to miejsce w przypadku degradacji cyklin mitotycznych? Fakt, że w komórkach drożdży degradacja inhibitora wymaga udziału ubikwityny [156] sugeruje, że i w komórkach ssaków proces ten może zachodzić podobnie.

Uderzające są korelacje pomiędzy zakłóceniami w funkcjonowaniu inhibitorów kinaz cdk, a pojawieniem się nowotworów. Inhibitory odpowiedzialne są bowiem nie tylko za prawidłowe funkcjonowanie produktów kilku genów supresorowych. Ekspresja genów kodujących inhibitory może być także regulowana przez białka supresorowe. Co więcej, niektóre z inhibitorów traktuje się wręcz jako białka sup-

resorowe. Najbliższe miesiące przyniosą niewątpliwie nowe fascynujące informacje o tych białkach.

Artykuł otrzymano 22 lutego 1995 r.  
Zaakceptowano do druku 15 marca 1995 r.

## Piśmiennictwo

- Hunter T (1993) *Cell* 75: 839-841
- Weinert T, Lydall D (1993) *Seminars Cancer Biol.* 4: 129-140
- Murray A W (1992) *Nature (land)* 359: 599-604
- Murray A (1994) *Curr Op Cell* 6: 872-876
- Hartwell L H, Kastan M B (1994) *Science* 266: 1821-182
- Dou Q P, Levin A H, Zhao S, Pardee A B (1993) *Cancer Res* 53: 1493-1497
- Pines J, Hunter T (1991) *Trends Cell Biol* 1: 117-121
- Jakubowicz T (1991) *Post Biochem* 37: 9-18
- Grzelakowska-Sztabert B (1992) *Post Biochem* 38: 98-107
- Pines J (1993) *Trends Biochem Sci* 18: 195-197
- Nigg E A (1993) *Trends Cell Biol* 3: 296-301
- Colomer J, Lopez-Girona J, Agell N, Bachs O (1994) *Biochem Biophys Res Commun* 200: 306-312



13. Reed SI (1992) *Annu Rev Cell Biol* 8: 529-561
14. Motokura T, Arnold A (1993) *Biochim Biophys Acta* 1155: 63-78
15. Van Heuvel S, Harlow E (1993) *Science* 262: 2050-2052
16. Lew J, Wang JH (1995) *Trends Biochem Sci* 20: 33-37
17. Reddy GPV (1994) *J Cell Biochem* 54: 379-389
18. Lock LF, Wickramasinghe D (1994) *Trends Cell Biol* 4: 404-406
19. Meyerson M, Enders GH, Wu CL, Su LK, Gorka C, Nelson C, Harlow E, Tsai LH (1992) *EMBO J* 11: 2909-2917
20. Meyerson M, Harlow E (1994) *Mol Cell Biol* 14: 2077-2086
21. Demetrick DJ, Zhang H, Beach DH (1994) *Cytogenet Cell Genet* 66: 72-74
22. Sherr CJ (1993) *Cell* 73: 1059-1065
23. Sherr CJ (1994) *Cell* 79: 551-555
24. Draetta GF (1994) *Curr Op Cell Biol* 6: 842-846
25. Richardson HE, Stueland CS, Thomas J, Russell P, Reed A (1990) *Genes Dev* 4: 1332-1344
26. Draetta G (1993) *Trends Cell Biol* 3: 287-289
27. Coleman TR, Dunphy WG (1994) *Curr Op Cell Biol* 6: 887-882
28. Atherton-Fessler S, Liu F, Gabrielli B, Lee MS, Peng CY, Piwnicka-Worms H (1994) *Mol Biol Cell* 5: 989-1001
29. Pines J (1993) *Current Biol* 3: 544-547
30. De Bondt HL, Rossenblatt J, Jancarik J, Jones HD, Morgan DO, Kim SH (1993) *Nature (Lond)* 363: 595-602
31. Nevins JR (1992) *Science* 258: 424-429
32. Lees E, Faha B, Dulic V, Reed SI, Harlow E (1992) *Genes Dev* 6: 1874-1885
33. Xiong Y, Zhang H, Beach D (1992) *Cell* 71: 505-514
34. Xiong Y, Hannon GJ, Zhang H, Casso D, Kobayashi R, Beach D (1993) *Nature (Lond)* 366: 701-704
35. Xiong Y, Zhang H, Beach D (1993) *Genes Dev* 7: 1572-1583
36. Zhang H, Xiong Y, Beach D (1993) *Mol Biol Cell* 4: 897-906
37. Zhang H, Hannon GJ, Beach D (1994) *Genes Dev* 8: 1750-1758
38. Prelich G, Tan CK, Koitura M, Mathews MB, So AG, Downey KM, Stillman B (1987) *Nature (Lond)* 326: 517-520
39. Shiviji MKK, Kenny MK, Wood RD (1992) *Cell* 69: 367-374
40. Pines J (1994) *Trends Biochem Sci* 19: 143-145
41. Nasmyth K, Hunt T (1993) *Nature (Lond)* 366: 634-635
42. Peter M, Herskowitz I (1994) *Cell* 79: 181-184
43. Elledge SJ, Harper JW (1994) *Curr Op Cell Biol* 6: 847-852
44. Hunter T, Pines J (1994) *Cell* 79: 573-582
45. Epifanova OI, Brooks RF (1994) *Cell Prolif* 27: 373-394
46. Harper JW, Adams GR, Wei N, Keyomarsi K, Elledge SJ (1993) *Cell* 75: 805-816
47. El-Deiry WS, Tokino T, Velculescu VE, Levy DB, Parsons R, Trent JM, Lin D, Mercer WE, Kinzler KW, Vogelstein B (1993) *Cell* 75: 817-825
48. Noda A, Ning Y, Venable SF, Pereira-Smith OM, Smith JR (1994) *Exp Cell Res* 211: 90-98
49. Gu Y, Turk CW, Morgan DO (1993) *Nature (Lond)* 366: 707-710
50. Huppi K, Siwarski D, Dosik J, Michieli P, Chedid M, Reed SI, Mock B, Givol D, Muschinski JF (1994) *Oncogene* 9: 3017-3020
51. Chedid M, Michieli P, Lenger L, Huppi K, Givol D (1994) *Oncogene* 9: 3021-3024
52. Li Y, Jenkins C W, Nichols M, Xiong Y (1994) *Oncogene* 9: 2261-2268
53. El-Deiry WS, Harper JW, O'Connor PM, Velculescu VE, Canman CE, Jackman J, Pietenpol JA, Burrell M, Hill DE, Wang Y, Wiman KG, Mercer WE, Kastan MB, Kohn KW, Elledge SJ, Kinzler KW, Vogelstein B (1994) *Cancer Res* 54: 1169-1174
54. Sheikh MS, Li XS, Chen JC, Chao ZM, Ordonez JV, Fontana JA (1994) *Oncogene* 9: 3407-3415
55. DiLeonardo A, Linke SP, Clarkin K, Wahl GM (1994) *Genes Dev* 8: 2540-2551
56. Dulic V, Kaufman WK, Wilson SJ, Tlsty TD, Lees E, Harper JW, Elledge JS, Reed SI (1994) *Cell* 76: 1013-1023
57. Wagner AJ, Kokontis JM, Hay N (1994) *Genes Dev* 8: 2817-2830
58. Fan S, El-Deiry WS, Bae I, Freeman J, Jondle D, Bhatia K, Fornace AJ jr, Magrath I, Kohn KW, O'Connor PM (1994) *Cancer Res* 54: 5824-5830
59. Steinman RA, Hoffman B, Iro A, Guillouf C, Lieberman DA, El-Houseini ME (1994) *Oncogene* 9: 3389-3396
60. Jiang H, Lin F, Su Z, Collart FR, Huberman E, Fischer PB (1994) *Oncogene* 9: 3397-3406
61. Michieli P, Chedid M, Lin D, Pierce JH, Mercer WE, Givol D (1994) *Cancer Res* 54: 3391-3395
62. Strausfeld UP, Howell M, Rempel R, Maller JL, Hunt T, Blow JJ (1994) *Curr Biol* 4: 876-883
63. Waga S, Hannon GJ, Beach D, Stillman B (1994) *Nature (Lond)* 369: 574-578
64. Li R, Waga S, Hannon GJ, Beach D, Stillman B (1994) *Nature (Lond)* 371: 534-537
65. Flores-Rozas H, Kelman Z, Dean FB, Pan ZQ, Harper JW, Elledge JS, O'Donnell M, Hurwitz J (1994) *Proc Natl Acad Sci* 91: 8655-8659
66. Shiviji MKK, Greg SJ, Strausfeld UP, Wood RD, Blow JJ (1994) *Current Biol* 4: 1062-1068
67. Pines J (1994) *Nature (Lond)* 369: 520-521
68. Massague J (1990) *Annu Rev Cell Biol* 6: 597-641
69. Massague J, Cheifetz S, Laiho M, Ralph DA, Weis FM B, Zentella A (1992) *Cancer Surv* 12: 81-103
70. Keyomarsi K, Sandowil L, Band V, Pardee AB (1991) *Cancer Res* 51: 3602-3609
71. Kato J, Matsuoka M, Polyak K, Massague J, Sherr CJ (1994) *Cell* 79: 487-496
72. Polyak K, Lee M, Erdjument-Bromage H, Koff A, Roberts JM, Tempst P, Massague J (1994) *Cell* 78: 59-66
73. Toyoshima H, Hunter T (1994) *Cell* 78: 67-74
74. Firpo EJ, Koff A, Solomon MJ, Roberts JM (1994) *Mol Cell Biol* 14: 4889-4901
75. Nourse J, Firpo E, Flanagan WM, Coats S, Polyak K, Lee MH, Massague J, Crabtree GR, Roberts JM (1994) *Nature (Lond)* 372: 570-573
76. Polyak K, Kato J, Solomon MJ, Sherr CJ, Massague J, Roberts JM, Koff A (1994) *Genes Dev* 8: 9-22
77. Koff A, Ohtsuki M, Polyak K, Roberts JM, Massague J (1994) *Science* 260: 536-539
78. Abraham SE, Carter MC, Moran E (1994) *Mol Biol Cell* 3: 655-665
79. Ewen ME, Sluss KH, Whitehouse LL, Livingston DM (1993) *Cell* 74: 1009-1020
80. Satterwhite DJ, Aakre ME, Gorska AE, Moses HL (1994) *Cell Growth Differ* 5: 789-799
81. Slingerland JM, Hengst L, Pan C, Alexander D, Stampfer MR, Reed SI (1994) *Mol Cell Biol* 14: 3683-3694
82. Geng J, Weinberg RA (1993) *Proc Natl Acad Sci* 90: 10315-10319
83. Matsushime H, Ewen ME, Strom D, Kato JY, Hanks S, Roussel M, Sherr CJ (1992) *Cell* 71: 323-334
84. Dowdy S, Hinds P, Louie K, Reed SI, Arnold A, Weinberg RA (1993) *Cell* 73: 499-511
85. Ewen ME, Sluss KH, Sherr CJ, Matsushime H, Kato JY, Livingston DM (1993) *Cell* 73: 483-497
86. Kato JY, Matsushime H, Hiebert SW, Ewen ME, Sherr CJ (1993) *Genes Dev* 7: 331-342
87. Laiho M, De Caprio JA, Livingston DM, Massague J (1990) *Cell* 62: 175-185
88. Landesman Y, Pagano M, Draetta G, Rotter V, Funening NE, Kimchi A (1992) *Oncogene* 7: 1661-1665
89. Hiebert SW, Chellappan SP, Horowitz JM, Nevins JR (1992) *Genes Dev* 6: 177-185
90. Weintraub SJ, Prater SA, Dean DC (1992) *Nature (Lond)* 358: 259-261
91. Schwartz JK, Devoto SH, Smith EJ, Chellappan SP, Jakoi L, Nevins JR (1993) *EMBO J* 12: 1013-1020

92. Grzelakowska-Sztabert B (1995) *Kosmos*, **44** w druku
93. Hengst L, Dulic V, Slingerland JM, Lees E, Reed SI (1994) *Proc Natl Acad Sci* **91**: 5291-5295
94. Kamb A, Gruis NA, Weaver-Feldhaus J, Liu Q, Harshman K, Tavtigian SV, Stockert E, Day RS III, Johnson BE, Skolnick MH (1994) *Science* **264**: 436-440
95. Serrano M, Hannon GJ, Beach D (1993) *Nature (Lond)* **366**: 704-707
96. Draetta G (1990) *Trends Biochem Sci* **15**: 378-383
97. Xiong Y, Beach D (1991) *Trends Cell Biol* **2**: 77-81
98. Grzelakowska-Sztabert B (1993) *Post Biochem* **39**: 16-24
99. Hannon GJ, Beach D (1994) *Nature (Lond)* **371**: 257-261
100. Quelle DE, Ashmun RA, Shurtleff SA, Kato JY, Bar-Sagi D, Roussel MF, Sherr CJ (1993) *Genes Dev* **7**: 1559-1571
101. Zhang Y, Jiang W, Chen CJ, Lee CS, Kahn SM, Santella RM, Weinstein IB (1993) *Biochim Biophys Res Commun* **196**: 1010-1016
102. Nishida W, Fukuda Y, Komeda T, Kita R, Sancho T, Furukawa M, Amenomori M, Shibagaki J, Nakao K, Ikenaga M, Ishizaki K (1994) *Cancer Res* **54**: 3107-3110
103. Leach FS, Elledge SJ, Sherr CJ, Wilson JK V, Markowitz S, Kinzler KW, Vogelstein B (1993) *Cancer Res* **53**: 1986-1989
104. Serrano M, Gornez-Lahoz, Delinho RA, Beach D, Bar-Sagi D (1995) *Nature (Lond)* **267**: 249-252
105. Lovec H, Serving A, Lucibello FC, Müller R, Möröy T (1994) *Oncogene* **9**: 323-326
106. Tam SW, Shay JW, Pagano M (1994) *Cancer Res* **54**: 5816-5820
107. Bates S, Parry D, Bonetta L, Vousden K, Dickson C, Peters G (1994) *Oncogene* **9**: 1633-1640
108. Li Y, Nichols MA, Shay JW, Xiong Y (1994) *Cancer Res* **54**: 6078-6082
109. Schulze A, Zerfass K, Spitkowsky D, Henglein B, Jansen-Durr P (1994) *Oncogene* **9**: 3475-3482
110. Otterson GA, Kratzke RA, Coxon A, Kim YW, Kaye FJ (1994) *Oncogene* **9**: 3375-3378
111. Nobori T, Miura K, Wu D, Lois A, Takabayashi K, Carson DA (1994) *Nature (Lond)* **368**: 753-756
112. Marx J (1994) *Science* **264**: 344-345
113. Bonetta L (1994) *Nature (Lond)* **370**: 180
114. Marx J (1994) *Science* **264**: 1846
115. Ohta M, Nagai H, Shimizu M, Rasio D, Berd D, Mastrangelo M, Singh AD, Shields JA, Shields CL, Croce CM, Hucloner K (1994) *Cancer Res* **54**: 5269-5272
116. Zhang SY, Klein-Szanto AJP, Sauter ER, Shafarenko M, Mitsumaga S, Nobori T, Carson DA, Ridge JA, Goodrow TL (1994) *Cancer Res* **54**: 5050-5053
117. Cairns P, Mao L, Merlo A, Lee DJ, Schwab D, Eloy Y, Tokino K, Van der Riet P, Blaugrund JE, Sidransky D (1994) *Science* **265**: 415-416
118. Cheng JQ, Jhanwar SC, Klein WM, Bell DW, Lee WC, Altomare DA, Nobori T, Olopade OI, Bucler AJ, Testa JR (1994) *Cancer Res* **54**: 5547-5551
119. Spruck III C, Gonzales-Zulueta N, Shibata A, Simoneau AR, Lin MF, Gonzales F, Tsai YC, Jones PA (1994) *Nature (Lond)* **370**: 183-184
120. Igaki H, Sasaki H, Kishi T, Sakamoto H, Tachimori Y, Kato H, Watanabe H, Sugimura T, Tenada M (1994) *Biochem Biophys Res Commun* **203**: 1090-1095
121. Mori T, Miura K, Aoki T, Nishihira T, Mori S, Nakamura Y (1994) *Cancer Res* **54**: 3396-3397
122. Jen J, Harper JW, Bigner SH, Bigner DD, Papadopoulos W, Markowitz S, Willson JK V, Kinzler K W, Vogelstein B (1994) *Cancer Res* **54**: 6353-6358
123. Giani C, Finocchiaro G (1994) *Cancer Res* **54**: 6338-6339
124. Schmidt EE, Ichimura K, Reifemberger G, Collins VP (1994) *Cancer Res* **54**: 6321-6324
125. Duro D, Flexor MA, Bernard O, d'Agay MF, Berger R, Larsen CJ (1994) *C R Acad Sci Sciences de la Vie* **317**: 913-919
126. Ueki H, Rubio MP, Romesh VB, Correa KM, Rutter JL, von Deimling A, Buckler AJ, Gusella JF, Louis DN (1994) *Human Molec Gen* **3**: 1841-1845
127. Walker DG, Duan W, Popovic EA, Kaye AH, Tomkinson FH, Lavin M (1995) *Cancer Res* **55**: 20-23
128. Xu L, Sgroi D, Sterner CI, Beauchamp RL, Pinney DM, Keel S, Ueki K, Rutter JL, Buckler AJ, Louis DN, Gusella JF, Ramesh V (1994) *Cancer Res* **54**: 5262-5264
129. He J, Allen JR, Collins VP, Allcelunis-Turner MJ, Godbout R, Day R S III, James CD (1994) *Cancer Res* **54**: 5804-5807
130. Khatib ZA, Matsushime H, Valentine M, Shapiro DN, Sherr CJ, Look AT (1993) *Cancer Res* **53**: 5535-5541
131. Reifemberger G, Reifemberger J, Ichimura K, Meltzer PS, Collins VP (1994) *Cancer Res* **54**: 4299-4303
132. Weaver-Feldhaus J, Gruis NA, Neuhausen S, Le Paslier D, Stocker E, Skolnick MH, Kamb A (1994) *Proc Natl Acad Sci* **91**: 7563-7567
133. Guan KL, Jenkins CW, Li Y, Nichols MA, Wu X, O'Keefe CL, Matera AG, Xiong Y (1994) *Genes Dev* **8**: 2939-2952
134. Peters G (1994) *Nature (Lond)* **371**: 204-205
135. Rodeck U, Bossler A, Graeven U, Fox FE, Nowell PC, Knabbe C, Kari C (1994) *Cancer Res* **54**: 575-581
136. Meijer L, Pondaven P (1988) *Exp Cell Res* **174**: 116-129
137. Neant I, Guerrier P (1988) *Exp Cell Res* **176**: 68-79
138. Vesely J, Havlicek K, Strnad M, Blow JJ, Donella-Deana A, Pinna L, Letham DS, Kato J, Detivaud L, Leclerc S, Meijer L (1994) *Eur J Biochem* **224**: 771-786
139. Kobayashi S, Ishiguro K, Omori A, Takamatsu M, Arioka M, Imahori K, Uchida I (1993) *Fehs Lett* **335**: 171-175
140. Paudel HK, Lew J, Ali Z, Wang JH (1993) *J Biol Chem* **268**: 23512-23518
141. Kitagawa M, Okabe T, Ogino H, Matsumoto H, Takahashi JS, Kokubo T, Higashi H, Saitoh S, Taya Y, Yasuda H, Ohba Y, Nishimura S, Okuyama A (1993) *Oncogene* **8**: 2425-2432
142. Kitagawa M, Higashi H, Takahashi IS, Okabe T, Ogino H, Taya Y, Nishimura S, Okuyama A (1994) *Oncogene* **9**: 2549-2557
143. Somaya A, Tanaka N, Okuyama A (1994) *Biochim Biophys Res Commun* **198**: 536-545
144. Worland PJ, Kaur G, Stetler-Stevenson M, Sebers S, Sartor O, Sausville EA (1993) *Biochem Pharmacol* **46**: 1831-1840
145. Ingbor D, Fujita T, Kishimoto S, Sudo K, Kanamaru T, Brem H, Folkman J (1990) *Nature (Lond)* **348**: 555-557
146. Abe J, Zhou W, Takuwa N, Taguchi J, Kurokawa K, Kumada M, Takuwa Y (1994) *Cancer Res* **54**: 3407-3412
147. Hori A, Ikeyama S, Sudo K (1994) *Biochem Biophys Res Commun* **204**: 1067-1073
148. Crissman HA, Gadbois DM, Tobey RA, Bradbury EM (1991) *Proc Natl Acad Sci* **88**: 7580-7584
149. Abe K, Yoshida M, Usui T, Horinouchi S, Beppu T (1991) *Exp Cell Res* **192**: 122-127
150. Gadbois DM, Hamaguchi JR, Swank RA, Bradbury EM (1992) *Biochim Biophys Res Commun* **184**: 80-85
151. Schnier JB, Gadbois DM, Nishi K, Bradbury EM (1994) *Cancer Res* **54**: 5959-5963
152. Gong J, Traganos F, Darzynkiewicz Z (1994) *Cancer Res* **54**: 3136-3139
153. Peter M, Gartner A, Horecka J, Ammerer G, Herskowitz J (1993) *Cell* **73**: 747-760
154. Peter M, Herskowitz J (1994) *Science* **265**: 1228-1231
155. Donowan JD, Toyn JH, Johnson AL, Johnston LH (1994) *Genes Dev* **8**: 1640-1653

156. Schwob E, Bohm T, Mendenhall MD, Nasmyth K (1994) *Cell* **79**: 233-244
157. Moreno S, Nurse P (1994) *Nature* (Lond) **367**: 236-242
158. Murray AW (1994) *Nature* (Lond) **367**: 219-220
159. Pines J (1994) *Nature* (Lond) **371**: 742-743
160. Gyuris J, Golemis E, Czarkow H, Brent R (1993) *Cell* **75**: 791-803
161. Hannon GJ, Casso D, Beach D (1994) *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 1731-1735

#### **Addendum:**

Ostatnio szczególne zainteresowanie wzbudza zasygnalizowany już w artykule (rozdział III-1) udział białka p21 w różnicowaniu komórek (1-4), zwłaszcza komórek mięśni szkieletowych (2-4). Wykazano, że w indukcji ekspresji genu PIC1 w różnicujących się komórkach mięśniowych uczestniczy przede wszystkim czynnik transkrypcyjny MyoD, nie bierze zaś udziału białko supresorowe p53. Ostatnio także, identyfikując aktywne regiony cząsteczki białka p21, udokumentowano udział fragmentu peptydu w pobliżu N-końca w hamowaniu aktywności kinaz cdk (5, 6, 8), natomiast fragmentu w pobliżu C-końca w blokowaniu działania PCNA (6, 7, 8).

#### **Piśmiennictwo**

1. Zhang W, Grasso L, McClain CD, Gambel AM, Cha Y, Trayali S, Deisseroth AB, Mercer WE (1995) *Cancer Res* **55**, 668-674
2. Halevy O, Novitch BG, Spicer DB, Skapek SX, Rhee J, Hannon GJ, Beach D, Lassar AB (1995) *Science* **267**, 1018-1021
3. Skapek SX, Rhee J, Spicer DB, Lassar AB (1995) *Science* **267**, 1022-1024
4. Parker SB, Eichele G, Zhang P, Rawls A, Sands AT, Bradley A, Olson EN, Harper JW, Elledge SJ (1995) *Science* **267**, 1024-1027
5. Nakanishi M, Robetorye RS, Adami GR, Pereira-Smith OM, Smith JR (1995) *EMBO J* **14**, 555-563
6. Chen J, Jackson PK, Kirschner MW, Dutta A (1995) *Nature* (Lond) **374**, 386-388
7. Warbrick E, Lane DP, Glover DM, Cox LS (1995) *Curr Biol* **5**, 275-282
8. Luo Y, Hurwitz J, Massague J (1995) *Nature* (Lond) **375**, 159-161

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

**Obecny adres:**

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

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

# Regulacja odpowiedzi szoku termicznego *Escherichia coli*

## Regulation of the *Escherichia coli* heat shock response

KRZYSZTOF LIBEREK\*

Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Rola czynnika  $\sigma^{32}$  — podjednostki polimerazy RNA w transkrypcji genów białek szoku termicznego
- III. Regulacja syntezy białka  $\sigma^{32}$ 
  - III-1. Regulacja transkrypcji genu *rpoH* kodującego białko  $\sigma^{32}$
  - III-2. Regulacja translacji *rpoH* mRNA
- IV. Stabilność białka  $\sigma^{32}$
- V. Autoregulacja odpowiedzi szoku termicznego
  - V-1. Białka opiekuńcze uczestniczące w regulacji odpowiedzi szoku termicznego
  - V-2. Mechanizm autoregulacji odpowiedzi szoku termicznego
- VI. Regulacja odpowiedzi szoku termicznego w innych bakteriach
- VII. Regulacja odpowiedzi szoku termicznego w komórkach eukariotycznych
- VIII. Podsumowanie

**Wykaz stosowanych skrótów:** Hsp — białka szoku termicznego; HSF — czynnik szoku termicznego, białko regulatorowe; hse — sekwencja DNA wiążąca czynnik szoku termicznego; Hsp70 — białko należące do klasy białek szoku termicznego o masie około 70 kD.

### I. Wstęp

Komórki prokariotyczne i eukariotyczne odpowiadają na podwyższenie temperatury nieznacznie ponad wartość fizjologiczną, wzmożoną syntezą grupy polipeptydów zwanych białkami szoku termicznego (*Hsp-heat shock proteins*) [1-3]. Do indukcji syntezy tych białek dochodzi również w wyniku działania całego szeregu innych czynników stresowych takich jak: infekcja wirusowa, czynniki uszkodzające DNA, analogi aminokwasów, zmiana pH środowiska, czy obecność etanolu. Białka szoku termicznego pochodzące z różnych organizmów charakteryzują się wysokim stopniem homologii zarówno na poziomie sekwencji aminokwasowej jak i struktury.

Przeniesienie komórek bakterii *Escherichia coli* z temperatury 30°C do 42°C powoduje wzrost syntezy ponad dwudziestu białek szoku termicznego [4,5]. Wiele z tych białek (GroEL, GroES, DnaK, DnaJ,

Contents:

- I. Introduction
- II. Role of  $\sigma^{32}$ -RNA polymerase subunit in the transcription of heat shock genes
- III. Regulation of the  $\sigma^{32}$  protein synthesis
  - III-1. Control of *rpoH* transcription
  - III-2. Control of *rpoH* translation
- IV. Stability of  $\sigma^{32}$  protein
- V. Autoregulation of the heat shock response
  - V-1. Chaperone proteins involved in the regulation of the heat shock response
  - V-2. Mechanism of the autoregulation of the heat shock response
- VI. Heat shock response in other bacteria
- VII. Heat shock response in *Eukaryotes*
- VIII. Conclusion

GrpE, ClpX) to białka klasy białek opiekuńczych (*chaperone proteins*) [6]. Uczestniczą one w procesie prawidłowego zwijania polipeptydów syntetyzowanych w komórce oraz dysocjacji i tworzeniu kompleksów białkowych. Inne, liczne białka szoku termicznego to proteazy lub białka współpracujące z nimi (Lon, ClpP, ClpA, ClpB, ClpX, hflX, hflK, hflC, hflB) [7]. Sądzi się, że funkcja proteolityczna jak i opiekuńcza białek szoku termicznego niezbędna jest komórce z uwagi na wielokrotną liczbę nieprawidłowo zwiniętych polipeptydów, czy też niefunkcjonalnych kompleksów białkowych pojawiających się w warunkach stresowych. Większość białek Hsp *E. coli* (GroEL, GroES, DnaK, DnaJ, GrpE, HtpG, Lon, ClpB, ClpP, ClpX) posiada swoje odpowiedniki (białka homologiczne) w komórkach eukariotycznych [7,8].

Indukcja syntezy białek szoku termicznego następuje natychmiast po przeniesieniu komórek do podwyższonej temperatury, a szybkość syntezy osiąga po czasie 5-10 minut maksimum kilka do kilkunastokrotnie przewyższając szybkość syntezy białek szoku w warunkach fizjologicznych. Następnie, w ciągu 20-30 minut, szybkość syntezy tych białek stopniowo spada i ustala się nowy stan równowagi, w którym synteza białek szoku termicznego w komórce jest około dwukrotnie wyższa niż w temperaturze 30°C [9-11]. Podwyższenie temperatury hodowli bakteryjnej do 46°C-50°C powoduje nie tylko indukcję syntezy białek szoku termicz-

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

nego, ale także zatrzymanie syntezy wszystkich innych białek [12]. W tych warunkach dwa główne białka szoku termicznego DnaK i GroEL stanowią około 20% wszystkich białek komórkowych [12].

Całość procesów zachodzących w komórce w wyniku działania czynników stresowych obejmująca zarówno indukcję syntezy białek szoku termicznego jak i następujący po niej proces hamowania syntezy tych białek nazywamy odpowiedzią szoku termicznego (*heat shock response*) [13-19].

## II. Rola czynnika $\sigma^{32}$ — podjednostki polimerazy RNA w transkrypcji genów białek szoku termicznego

pozytywnym regulatorem odpowiedzi szoku termicznego jest produkt genu *rpoH* (*htpR*) [20, 21], który został zidentyfikowany jako podjednostka sigma ( $\sigma^{32}$ ) polimerazy RNA [22]. Podjednostka ta współdziała z rdzeniem polimerazy RNA (podjednostki  $\alpha, \beta, \beta'$ ) w transkrypcji DNA i odpowiedzialna jest za rozpoznawanie promotorów genów białek szoku termicznego [23]. Gen *rpoH* jest genem istotnym dla bakterii (*essential*), gdyż delecja tego genu jest letalna w temperaturach przewyższających 20°C [24]. Oprócz zahamowania wzrostu w warunkach fizjologicznych mutanty w genie *rpoH* wykazują defekty przebiegu proteolizy [25], podziałów komórkowych [26] i replikacji DNA bakteriofagów  $\lambda$  i P1 [27]. Wydaje się, że tak plejotropowy efekt mutacji *rpoH* spowodowany jest brakiem lub niedoborem niektórych białek szoku termicznego, gdyż równoczesna nadprodukcja białek GroEL i GroES częściowo niweluje fenotyp mutacji *rpoH* [28]. Wyniki te wskazują na to, że białka szoku termicznego są niezbędne nie tylko w warunkach podwyższonej temperatury, ale pełnią także istotne funkcje w warunkach fizjologicznych (beztresowych).

Białko  $\sigma^{32}$  kontroluje transkrypcje genów białek szoku termicznego zarówno w warunkach stresowych jak i fizjologicznych [24]. Niektóre geny białek szoku termicznego (np. *groES*, *groEL*, *grpE*, *rpoD*) posiadają zarówno promotory zależne od  $\sigma^{70}$  jak i od  $\sigma^{32}$ , co zapewnia wyższy poziom ekspresji tych białek w warunkach fizjologicznych [23, 24, 29]. Sekwencje promotorowe rozpoznawane przez  $\sigma^{32}$  są znacząco różne od sekwencji promotorów genów rozpoznawanych przez czynnik  $\sigma^{70}$  [23]. Inny jest zarówno rejon -10 jak i -35 oraz odległość pomiędzy tymi rejonami (Ryc. 1). Polimeraza RNA współdziałająca z  $\sigma^{32}$  ( $E\sigma^{32}$ ) nie rozpoznaje promotorów  $\sigma^{70}$ -zależnych, podobnie jak  $E\sigma^{70}$  nie rozpoznaje promotorów  $\sigma^{32}$ -zależnych. Jedyнным znanym wyjątkiem jest promotor p1 genu *rrnB*, który jest rozpoznawany przez  $E\sigma^{70}$  jak i  $E\sigma^{32}$  [30].

Niski poziom (10-30 kopii) białka  $\sigma^{32}$  w komórce bakteryjnej jest czynnikiem limitującym syntezę białek szoku termicznego w warunkach beztresowych (temp. 30°C) [31]. Indukcja syntezy białek szoku termicznego osiągnięta jest poprzez 15-20-krotny, gwałtowny wzrost

stężenia czynnika  $\sigma^{32}$  w komórce. Poziom  $\sigma^{32}$  w komórce kontrolowany jest poprzez skomplikowany mechanizm, w którym kluczową rolę odgrywa aktywacja transkrypcji i translacji genu *rpoH*, oraz zmiana stabilności i aktywności czynnika  $\sigma^{32}$ . Wzrost stężenia  $\sigma^{32}$  w komórce doprowadza do zwiększonej transkrypcji genów białek szoku termicznego [32], co z kolei powoduje wzrost poziomu białek szoku termicznego w komórce. Gdy synteza białek szoku termicznego przekracza pewien poziom następuje jej hamowanie (negatywna regulacja odpowiedzi szoku termicznego).

## III. Regulacja syntezy białka $\sigma^{32}$

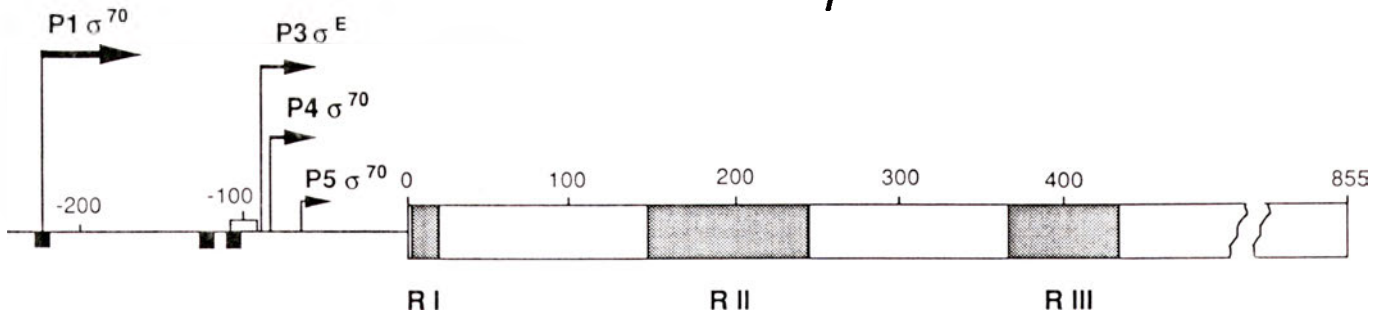
### III-1. Regulacja transkrypcji genu *rpoH* kodującego białko $\sigma^{32}$

Gen *rpoH* posiada co najmniej 4 promotory (Ryc. 2). Trzy z nich (P1, P4, P5) są transkrybowane przez polimerazę RNA współdziałającą z  $\sigma^{70}$  ( $E\sigma^{70}$ ) [33-35], a jeden (P3), jest rozpoznawany przez nowy czynnik sigma,  $\sigma^E$  ( $\sigma^{24}$ ) [36, 37]. Promotor P1 jest promotorem najsilniejszym i odpowiada za większość transkrypcji w warunkach fizjologicznych. W temperaturze 42°C transkrypcja z promotora P1 nie zmienia się, natomiast transkrypcja z P4 rośnie 2-3 krotnie [33, 34]. Bardzo interesujący jest promotor P3 zależny od czynnika  $\sigma^E$ . Wykazano, że wraz ze wzrostem temperatury rośnie transkrypcja z tego promotora, zaś w temperaturze 50°C transkrypcja genu *rpoH* zachodzi wyłącznie z promotora  $\sigma^E$  [36]. To spostrzeżenie wydaje się ważne, gdyż wyjaśnia jak zachodzi transkrypcja *rpoH* w temperaturach, w których promotory zależne od  $\sigma^{70}$  są nieczynne. Jak dotąd zidentyfikowano tylko dwa promotory rozpoznawane przez  $E\sigma^E$ . Jeden to właśnie promotor P3 *rpoH*, drugi zaś to promotor *htrA* (*degP*) [38] genu, który koduje serynową proteazę, istotną dla przeżycia bakterii w wysokiej temperaturze [39, 40]. Ostatnio sklonowano gen kodujący  $\sigma^E$  co umożliwi porównanie tego czynnika transkrypcyjnego z innymi bakteryjnymi czynnikami sigma [108, 109]. Pozostały, czwarty promotor P5 genu *rpoH* jest promotorem słabym. Transkrypcja z tego promotora jest aktywowana w warunkach niedoboru glukozy lub w wyniku dodania etanolu do hodowli bakteryjnej. Obecność cAMP i regulatorowego białka wiążącego cAMP (*cAMP receptor protein*) jest wymagana do efektywnej transkrypcji z tego promotora [35]. Miejsce potencjalnego wiązania białka wiążącego cAMP zostało zidentyfikowane i znajduje się 38-39 nukleotydów powyżej promotora P5 [35].

Rejon -35		Rejon -10	promotor
TCTCNCCTTGAA	13-17 pz	CCCCATNTA	$\sigma^{32}$ -zależny
TTGACA	16-18 pz	TATAAT	$\sigma^{70}$ -zależny

Ryc. 1. Porównanie sekwencji promotorów zależnych od czynników  $\sigma^{32}$  i  $\sigma^{70}$ .

# *rpoH*



RI - rejon I  
RII - rejon II  
RIII - rejon III

■ miejsce wiązania białka DnaA

□ miejsce wiązania białka wiążącego cAMP

Ryc. 2. Schemat rejonu regulatorowego oraz kodującego genu *rpoH*.

Obecność w rejonie promotorowym genu *rpoH* miejsc potencjalnie wiążących białko DnaA (białko inicjatorowe replikacji chromosomu *E. coli*) sugeruje, że transkrypcja genu *rpoH* może być regulowana poprzez wiązanie tego białka do DNA. *In vitro*, oczyszczone białko DnaA hamuje transkrypcję z promotorów P3 i P4 [41]. Wyniki te sugerują, że odpowiedź szoku termicznego może być powiązana z regulacją cyklu komórkowego.

### III-2. Regulacja translacji *rpoH* mRNA

Szereg wyników doświadczeń świadczy o tym, że wzrost syntezy  $\sigma^{32}$  wynika przede wszystkim ze zwiększenia translacji mRNA *rpoH*. Przeniesienie bakterii z 30°C do 42°C powoduje tylko około dwukrotny wzrost transkrypcji genu *rpoH*, natomiast ilość białka  $\sigma^{32}$  wzrasta ponad dziesięciokrotnie [32]. Ponadto maksymalny poziom syntezy  $\sigma^{32}$  w komórce wyprzedza maksymalną akumulację mRNA *rpoH* [32, 33]. Na g a i i w s p. [42] wykazali, używając fuzji genów kodujących  $\sigma^{32}$  i  $\beta$ -galaktozydazę, że po przeniesieniu bakterii do podwyższonej temperatury, pomimo zahamowania rifampicyną aktywności polimerazy RNA dochodzi do indukcji syntezy zrekombinowanego białka. Zwiększona intensywność translacji mRNA *rpoH* powoduje jego stabilizację co prowadzi do podniesienia stężenia mRNA *rpoH* w komórce [33, 34, 43].

Badania prowadzone w pracowniach Yury i Gross doprowadziły do zidentyfikowania dwóch rejonów mRNA *rpoH* odpowiedzialnych za regulację translacji *rpoH* (Ryc. 2) [42, 44]. Pierwszy rejon, zlokalizowany zaraz za miejscem startu translacji (6-20 nukleotyd), aktywuje translację genu mRNA *rpoH*. Jest on komplementarny do odcinka 16S rRNA i równocześnie podobny do szeregu sekwencji znalezionych

w genach bakteryjnych i fagowych, określanymi jako "downstream box", niezbędnych do wysokiego poziomu ekspresji genów prokariotycznych [45-47]. Sądzi się, że występowanie tej sekwencji stymuluje translację poprzez stabilizację wiązania mRNA do podjednostki 30S rybosomu [46]. Delecja tego rejonu powoduje 15-krotny spadek ekspresji badanych fuzji białkowych ( $\sigma^{32}$ - $\beta$ -galaktozydaza) [48]. Drugi rejon mRNA *rpoH*, zawarty pomiędzy nukleotydami 153-247, odpowiada za represję translacji tego mRNA w 30°C. Analiza sekwencji pokazała, że mRNA *rpoH* może wytworzyć strukturę drugorzędową zawierającą oba omawiane rejonu oraz rejon kodonu startowego, co w konsekwencji mogłoby doprowadzić do zahamowania inicjacji translacji [42, 49]. Do stymulacji translacji w wysokiej temperaturze dochodziłoby poprzez destabilizację drugorzędowej struktury mRNA. Wykazanie, że mutacje utrudniające powstanie drugorzędowej struktury mRNA podwyższają translację już w 30°C oraz nie powodują indukcji translacji w wyniku szoku termicznego, jest zgodne z tą hipotezą [42, 49].

Ostatnio zidentyfikowano trzeci rejon mRNA *rpoH* aktywny w procesie kontroli ekspresji  $\sigma^{32}$  [42, 44, 50]. Doświadczenia pokazały, że w wysokiej temperaturze kinetyka syntezy mRNA *rpoH* i białka  $\sigma^{32}$  jest różna. Pomimo wysokiego poziomu syntezy mRNA *rpoH* dochodzi do represji translacji tego mRNA [51]. Taka represja translacji nie zachodzi w szczepach niosących mutację w genach białek szoku termicznego *dnaK*, *dnaJ* oraz *grpE* [50, 52]. Dalsze badania wykazały, że rejon genu *rpoH* zawarty pomiędzy nukleotydami 364-433 (122-144 aminokwas białka  $\sigma^{32}$  od końca N-terminalnego) uczestniczy w zahamowaniu syntezy białka  $\sigma^{32}$  [50]. Doświadczenia z mutacjami zmieniającymi ramkę odczytu w tym rejonie genu *rpoH* wykazały, że za efekt ten odpowiada raczej sekwencja

aminokwasowa w białku nie zaś sekwencja nukleotydowa mRNA [50]. Możliwe, że oddziaływanie białek DnaK, DnaJ i GrpE z sekwencją zawartą pomiędzy 122 a 144 aminokwasem syntetyzowanej podjednostki  $\sigma^{32}$  prowadzi do zahamowania syntezy  $\sigma^{32}$  i wzmożonej degradacji niedokończonego łańcucha polipeptydowego. Alternatywnie, oddziaływanie białek DnaK, DnaJ i GrpE z tym rejonem białka  $\sigma^{32}$  może uaktywniać proteazy odpowiedzialne za degradację  $\sigma^{32}$ .

#### IV. Stabilność białka $\sigma^{32}$

Czynnik  $\sigma^{32}$  jest białkiem wyjątkowo niestabilnym. Czas połowicznej degradacji wynosi ok. 1 min i nie zależy od temperatury hodowli bakteryjnej [32, 51, 53]. Wprowadzenie do komórki plazmidu nadprodukcującego  $\sigma^{32}$  nie zmienia czasu połowicznej degradacji tego białka [53]. Ponadto wykazano, że mutacje w trzech genach białek szoku termicznego, *dnaK*, *dnaJ* i *grpE* wydłużają 10-20 razy czas połowicznej degradacji  $\sigma^{32}$  [52, 53]. Wyniki doświadczeń genetycznych sugerują więc, że białka DnaK, DnaJ i GrpE, należące do klasy białek opiekuńczych, biorą udział w procesie degradacji  $\sigma^{32}$ . Uważa się, że białka te poprzez wytworzenie kompleksu z podjednostką  $\sigma^{32}$  umożliwiają jej efektywną proteolizę [54]. Sherman i Goldberg [55] zaproponowali analogiczną rolę białek DnaK, DnaJ i GrpE w degradacji zmutowanej formy alkalicznej fosfatazy. Jednakże, jak dotychczas brak danych z doświadczeń *in vitro*, które potwierdzałyby hipotezę bezpośredniego oddziaływania kompleksu DnaK-białko z proteazą selektywnie degradującą to białko.

Białko  $\sigma^{32}$  ulega przejściowej stabilizacji w początkowym okresie działania stresu [32]. Mechanizm tej stabilizacji nie jest poznany. Przypuszcza się, że stabilizacja  $\sigma^{32}$  może być spowodowana wysyceniem, potencjalnie oddziałujących z  $\sigma^{32}$ , białek opiekuńczych DnaK, DnaJ i GrpE przez powstałe w komórce w warunkach stresowych zdenaturowane białka lub nieprawidłowo zestawione kompleksy białkowe [7]. Dzięki przejściowej stabilizacji istniejących w komórce kopii białka  $\sigma^{32}$ , odbywającej się szybciej niż proces syntezy  $\sigma^{32}$  *de novo*, możliwa jest natychmiastowa odpowiedź komórki na szok termiczny.

Jak dotąd nie zidentyfikowano proteazy lub systemu proteaz odpowiedzialnych za degradację  $\sigma^{32}$ . Szybka degradacja  $\sigma^{32}$  w szczepach z mutacjami w genach kodujących proteazy indukowane w czasie szoku termicznego (Lon, ClpP) sugeruje, że te zależne od ATP proteazy nie odgrywają istotnej roli w proteolizie  $\sigma^{32}$  [54]. Ostatnio wykazano, że gen *ftsH*, który jak sądzono zaangażowany jest w procesie podziału komórki, jest identyczny z genem *hflB* kodującym proteazę biorącą udział w degradacji białka cII bakteriofaga  $\lambda$  [56]. Wstępne wyniki z pracowni Boulouca sugerują, że produkt genu *hflB* (*ftsH*) może być zaangażowany w procesie degradacji  $\sigma^{32}$  [110].

## V. Autoregulacja odpowiedzi szoku termicznego

### V-1. Białka opiekuńcze uczestniczące w regulacji odpowiedzi szoku termicznego

Tilly i wsp. [57] wykazali, że mutacja w genie kodującym opiekuńcze białko szoku termicznego DnaK powoduje brak negatywnej autoregulacji odpowiedzi szoku termicznego. Analogiczne wyniki uzyskali następnie inni autorzy dla mutantów w genach *dnaJ* i *grpE* [52]. Sugeruje to, że przynajmniej te trzy białka szoku termicznego, należące do klasy białek opiekuńczych, biorą udział w procesie regulacji odpowiedzi szoku termicznego. Sekwencja aminokwasowa białka DnaK, jednego z głównych białek indukowanych w czasie szoku termicznego, jest w 50% homologiczna do sekwencji eukariotycznych białek należących do klasy Hsp70 [58]. Delecja genu *dnaK* jest możliwa tylko w warunkach powolnego wzrostu bakterii w pożywce minimalnej w obniżonej temperaturze [59]. Mutacje w genie *dnaK* upośledzają takie procesy jak: transport białek [60, 61], degradację białek [52, 55], replikację DNA *E. coli*, bakteriofagów  $\lambda$  i P1 oraz niektórych plazmidów bakteryjnych [27, 62]. Mutacje w genach *dnaJ* i *grpE* mają podobny efekt fenotypowy jak mutanty w genie *dnaK* co sugeruje, że produkty tych genów współdziałają ze sobą [27, 54]. Odtworzenie *in vitro* systemów replikacji DNA bakteriofagów  $\lambda$  [63, 64] i P1 [65] oraz pokazanie, że białka DnaJ i GrpE stymulują słabą aktywność ATPazową białka DnaK [66], potwierdziło tezę o współdziałaniu pomiędzy białkami DnaK, DnaJ i GrpE. Doświadczenia przeprowadzone w laboratorium Żylicza [67] pokazały, że *in vitro* białko DnaK jest zdolne do ochrony innych enzymów przed inaktywacją termiczną. Również w tym procesie białka DnaJ i GrpE współdziałają z DnaK i zwiększają jego zdolność do reaktywacji termicznie zainaktywowanych enzymów [68, 69].

Wyniki genetyczne pokazujące, że mutacje w genach *dnaK*, *dnaJ* i *grpE* w ten sam sposób upośledzają odpowiedź szoku termicznego oraz wykazanie wspólnego działania tych białek w szeregu innych procesów biochemicznych sugeruje, że DnaK współdziała z DnaJ i GrpE także w czasie regulacji odpowiedzi szoku termicznego.

### V-2. Mechanizm autoregulacji odpowiedzi szoku termicznego

Zarówno doświadczenia z wykorzystaniem ekstraktów bakteryjnych [70] jak i oczyszczonych białek [71, 72] wykazały, że białka szoku termicznego DnaK i DnaJ oddziałują z  $\sigma^{32}$ . Białko DnaK wykazuje słabe powinowactwo do  $\sigma^{32}$  natomiast produkt zmutowanego genu *dnaK765* (mutant *dnaK756* wykazuje upośledzenie odpowiedzi szoku termicznego) nie od-

działywuje z  $\sigma^{32}$  [71]. Również białko DnaJ wykazuje wysokie powinowactwo do  $\sigma^{32}$  [70, 72]. W obecności ATP dochodzi do utworzenia trwałego kompleksu DnaK- $\sigma^{32}$ -DnaJ [72]. Zastąpienie białka DnaJ produktem zmutowanego genu *dnaJ259* (mutant upośredzony w odpowiedzi szoku termicznego) powoduje, że trójskładnikowy kompleks DnaK- $\sigma^{32}$ -DnaJ259 nie tworzy się. Równocześnie stwierdzono, że białka DnaK i DnaJ nie oddziałują z natywnym czynnikiem  $\sigma^{70}$  [72]. Wykazano, że w obecności  $\sigma^{70}$  białka DnaK i DnaJ usuwają  $\sigma^{32}$  z kompleksu z polimerazą RNA [72] i w konsekwencji dochodzi do specyficznej inhibicji transkrypcji z promotorów genów szoku termicznego Bła s z c z a k, L i b e r e k (wyniki niepublikowane). B u k a u i w s p. (wyniki niepublikowane) stwierdzili, że obecność samego białka DnaJ blokuje powstawanie otwartego kompleksu (*open complex*) polimerazy RNA z zależnymi od podjednostki  $\sigma^{32}$  promotorami genów białek szoku termicznego. Podobna reakcja nie zachodzi w przypadku promotorów zależnych od  $\sigma^{70}$ .

Wyniki te pozwoliły na zaproponowanie hipotezy [7, 27, 54, 72], wyjaśniającej autoregulację odpowiedzi szoku termicznego przez białka DnaK, DnaJ i GrpE. W czasie wzrostu bakterii w warunkach fizjologicznych stężenie  $\sigma^{32}$  w komórce jest niskie. Dodatkowo obecne w komórce białka DnaK i DnaJ oraz GrpE obniżają aktywność obecnej w komórce  $\sigma^{32}$  poprzez wytworzenie kompleksu DnaK- $\sigma^{32}$ -DnaJ. Podwyższenie temperatury doprowadza do pojawienia się w komórce zdenaturowanych białek czy też nieprawidłowo zestawionych kompleksów białkowych, co zwiększa zapotrzebowanie na białka opiekuńcze. Nadmiar substratów dla białek opiekuńczych DnaK i DnaJ doprowadza do uwolnienia z kompleksu DnaK- $\sigma^{32}$ -DnaJ białka  $\sigma^{32}$  i jego uaktywnienia. Dodatkowo poziom  $\sigma^{32}$  wzrasta dzięki zwiększonej transkrypcji oraz odblokowaniu translacji W wyniku znacznego wzrostu stężenia  $\sigma^{32}$  w komórce, wzrasta synteza białek DnaK i DnaJ, które z kolei zaczynają oddziaływać z białkiem  $\sigma^{32}$  i powodują jego oddysocjowanie z kompleksu z polimerazą RNA. W ten sposób dochodzi z kolei do obniżenia transkrypcji genów szoku termicznego. Czynniki  $\sigma^{32}$  związane w kompleksie DnaK- $\sigma^{32}$ -DnaJ stają się substratem proteaz.

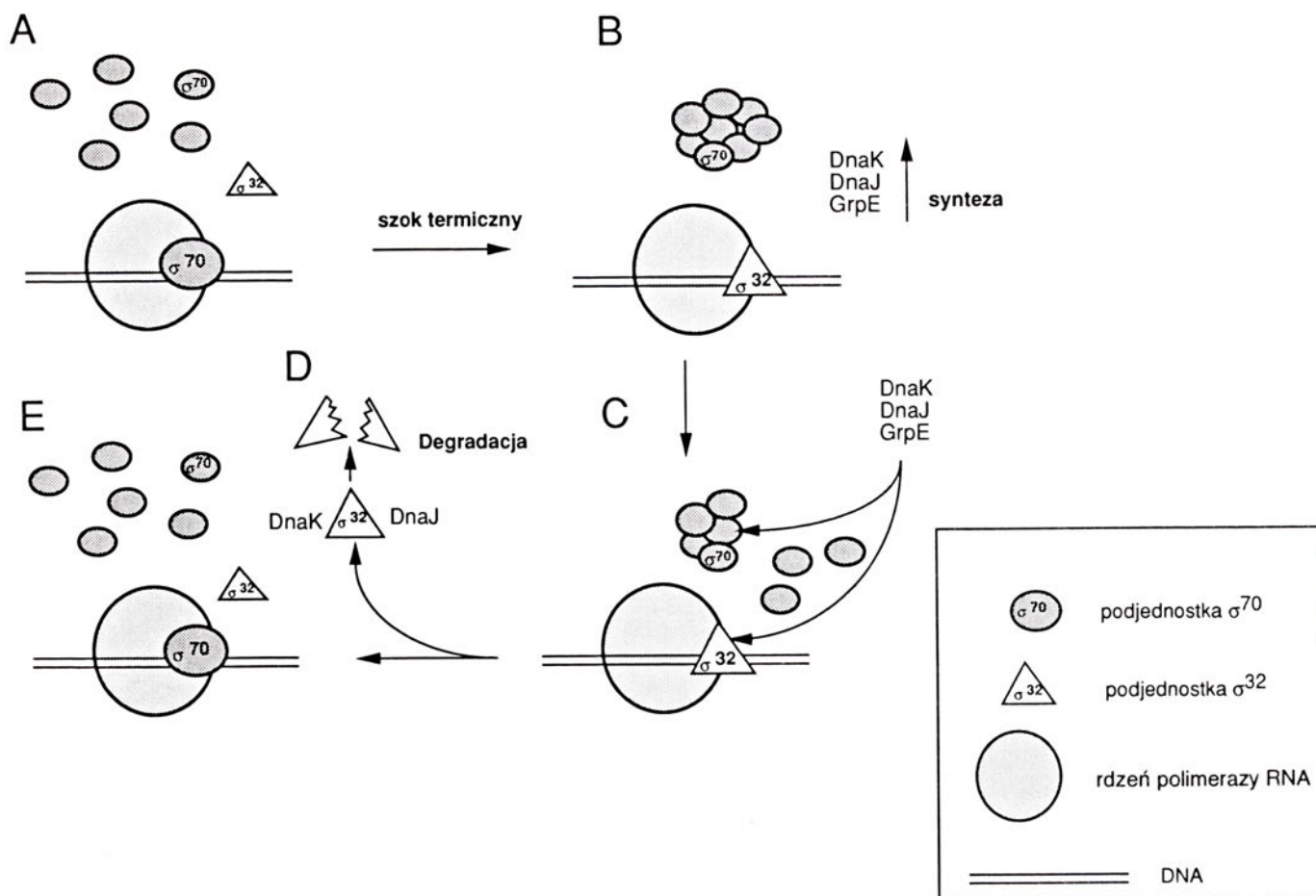
Ostatnio uzyskane wyniki sugerują, że oprócz oddysocjowania  $\sigma^{32}$  z kompleksu z polimerazą RNA białka DnaK, DnaJ i GrpE mogą pełnić dodatkową, ważną rolę w regulacji odpowiedzi szoku termicznego. Doświadczenie prowadzone w laboratorium Ż y l i c z a pokazały, że inkubacja holoenzymu polimerazy RNA zawierającego podjednostkę  $\sigma^{70}$  w temperaturze 50°C prowadzi do utraty aktywności tego enzymu. Białka opiekuńcze DnaK, DnaJ i GrpE mogą reaktywować ten enzym w zależnej od ATP reakcji [67, 69]. Za utratę aktywności holoenzymu polimerazy RNA odpowiada inaktywacja czynnika  $\sigma^{70}$ , który ulega

agregacji. Ten wynik sugeruje jak może dochodzić do wyłączenia transkrypcji z zależnych od  $\sigma^{70}$  promotorów po przeniesieniu bakterii do temperatury wyższej niż 45°C. Białka DnaK, DnaJ, GrpE w zależnej od ATP reakcji katalizują monomeryzację czynnika  $\sigma^{70}$  B ł a s z c z a k, L i b e r e k (wyniki niepublikowane). Reakcja ta wymaga wysokiego stężenia białek opiekuńczych, zachodzi więc efektywnie dopiero po indukcji syntezy tychże białek. Reaktywowany czynniki  $\sigma^{70}$  skutecznie konkuruje z czynnikiem  $\sigma^{32}$  o wiązanie do polimerazy RNA. Uzyskane wyniki sugerują, że w czasie wychodzenia z szoku termicznego białka DnaK, DnaJ i GrpE nie tylko bezpośrednio wpływają na asocjację czynnika  $\sigma^{32}$  z polimerazą RNA, ale także uczestniczą w reaktywacji termicznie zainaktywowanego czynnika  $\sigma^{70}$ . Konsekwencją obu procesów jest hamowanie syntezy białek szoku termicznego (proces wychodzenia z szoku termicznego) (Ryc. 3).

## VI. Regulacja odpowiedzi szoku termicznego w innych bakteriach

Zsekwencjonowanie rejonów promotorowych genów szoku termicznego pochodzących z różnych bakterii wykazało, że regulacja odpowiedzi szoku termicznego poprzez specyficzny czynniki sigma nie jest uniwersalna. Istnienie specyficznego czynnika homologicznego do  $\sigma^{32}$  oraz odrębnych promotorów genów szoku termicznego wykazano u bakterii należących do szeregu gatunków, głównie gram ujemnych [73-75]. Czynniki  $\sigma^{32}$  wyizolowany z morskiej bakterii *Vibrio harveyi* współdziała z polimerazą RNA pochodzącą z *E. coli* w transkrypcji genów białek szoku termicznego *E. coli*, co może świadczyć o wysokiej homologii czynników  $\sigma^{32}$  w tej grupie bakterii [76]. Okazało się jednak, że u bakterii należących do dużej grupy, głównie gram dodatnich gatunków, odpowiedź szoku termicznego jest regulowana inaczej. W bakteriach tych brak jest analogu  $\sigma^{32}$ , a transkrypcja genów szoku termicznego zachodzi wyłącznie z promotorów zależnych od analogu  $\sigma^{70}$  [77]. Zsekwencjonowanie rejonów promotorowych tych genów wykazało istnienie 9-nukleotydowej sekwencji odwróconych powtórzeń (*inverted repeats*) zdolnej do wytworzenia struktury szpilki do włosów (*hairpin*) [78]. Sekwencje te zlokalizowane są pomiędzy miejscem startu transkrypcji a miejscem startu translacji [79]. Sam mechanizm indukcji odpowiedzi szoku termicznego w tych organizmach nie został poznany, ale można spekulować, że możliwa jest regulacja ekspresji poprzez zmianę topologii DNA (lub RNA) genów kodujących białka szoku termicznego. Alternatywnie, może istnieć białko regulatorowe wiążące się do sekwencji odwróconych powtórzeń, którego aktywność jest modulowana w odpowiedzi na zmiany temperatury. Ten drugi sposób indukcji odpowiedzi szoku termicznego jest podobny do regulacji ekspresji genów szoku termicznego zachodzącej w komórkach eukariotycznych.





**Ryc. 3.** Hipotetyczny schemat udziału opiekuńczych białek DnaK, DnaJ i GrpE (białka Hsp) w regulacji odpowiedzi szoku termicznego *E. coli*. A. — fizjologiczne warunki wzrostu, większość cząstek polimerazy RNA współdziela z czynnikiem  $\sigma^{70}$ ; B. — podwyższenie temperatury ponad wartość fizjologiczną, inaktywacja czynnika  $\sigma^{70}$ , wzrost stężenia  $\sigma^{32}$  w komórce, zwiększenie syntezy białek szoku termicznego; C. — białka szoku termicznego DnaK, DnaJ i GrpE reaktywują czynnik  $\sigma^{70}$  oraz wysycają czynnik szoku termicznego  $\sigma^{32}$ ; D. — stymulowana przez DnaJ i DnaK degradacja  $\sigma^{32}$ ; E. — reaktywacja  $\sigma^{70}$  oraz degradacja  $\sigma^{32}$  doprowadza do zahamowania transkrypcji genów białek szoku termicznego, powrót do warunków fizjologicznych.

## VII. Regulacja odpowiedzi szoku termicznego w komórkach eukariotycznych

W komórkach eukariotycznych odpowiedź na szok termiczny jest regulowana na etapie inicjacji transkrypcji poprzez uaktywnienie specjalnego czynnika transkrypcyjnego zwanego czynnikiem szoku termicznego, HSF (*heat shock factor*) [79-81]. W komórkach drożdży czynnik ten jest związany z DNA, a jego aktywacja jest wynikiem fosforylacji [82, 83]. W komórkach wyższych organizmów eukariotycznych aktywacja transkrypcji następuje w wyniku wiązania czynnika szoku termicznego (HSF) do sekwencji DNA nazywanej hse (*heat shock element*) [80, 84-88]. Sekwencja hse wiążąca czynnik szoku termicznego to trzy powtórzenia pięcionukleotydowej sekwencji w zmiennej orientacji [nGAAn] [nTTCn] [nGAAn] [89, 90]. W komórkach drożdży (*Saccharomyces cerevisiae*) i muszki owocowej (*Drosophila melanogaster*) zidentyfikowano tylko jeden czynnik szoku termicznego (HSF) [91, 92]. W komórkach innych organizmów eukariotycznych zidentyfikowano przynajmniej dwa (mysz, człowiek) (HSF1, HSF2) lub trzy (pomidor, kura) (HSF1, HSF2, HSF3) czynniki szoku termicznego [93-97]. Doświadczenia z użyciem przeciwciał

specyficznych do określonych białek HSF pokazały, że różnią się one funkcjonalnie. Za indukcję odpowiedzi szoku termicznego w wyniku podwyższenia temperatury lub innych czynników stresowych (metale ciężkie, analogi aminokwasów) odpowiada HSF1, natomiast do aktywacji HSF2 dochodzi podczas specyficznych etapów rozwoju i różnicowania komórek [98, 99]. W warunkach fizjologicznych HSF1 występuje w cytoplazmie i jądrze komórkowym jako monomer. Warunki stresowe doprowadzają do oligomeryzacji HSF1 (trimer) i fosforylacji oraz transportu HSF1 do jądra komórkowego [100, 101]. Trimeryczna forma HSF1 jest formą aktywną, która poprzez wiązanie do sekwencji hse aktywuje transkrypcję genów szoku termicznego. Wszystkie znane czynniki szoku termicznego pomimo znacznych różnic w wielkości i tylko około 40% homologii posiadają dwie zachowane domeny. Pierwsza, obejmująca około 100 N-końcowych aminokwasów, jest homologiczna do bakteryjnych czynników sigma i odpowiada za wiązanie do DNA [92]. Druga, leżąca centralnie w białku HSF, zawiera hydrofobowe aminokwasy tworzące strukturę suwaków leucynowych (*leucine zipper*) i odpowiada za tworzenie aktywnych trimerów białka HSF [102]. Dodatkowa struktura suwaka leucynowego znajduje się na na C-końcu białka

HSF. Sądzi się, że w warunkach fizjologicznych oddziałuje ona z domeną drugą co powoduje utrzymanie czynnika szoku termicznego w monomerycznej, nieaktywnej formie [103]. Drożdżowy czynnik szoku termicznego nie posiada tej dodatkowej struktury suwaka leucynowego i występuje w komórce jako trimer w warunkach fizjologicznych [83].

Nadprodukcja czynnika szoku termicznego pochodzącego z komórek eukariotycznych w bakterii *E. coli* prowadzi do ekspresji aktywnej w transkrypcji, trimerycznej formy HSF [92, 94]. Nadprodukcja tego samego czynnika szoku termicznego w komórkach eukariotycznych doprowadza do uzyskania monomerycznej, nieaktywnej formy HSF [92, 95]. Sugeruje to, że w komórkach eukariotycznych znajduje się dodatkowe białko odpowiedzialne za negatywną kontrolę aktywności transkrypcyjnej HSF. Lindquist i wsp. [104] zaproponowali, że białkiem tym jest Hsp70 (eukariotyczny homolog bakteryjnego białka DnaK). W laboratorium Morimoto pokazano, że wyizolowane białko Hsp70 blokuje aktywność transkrypcyjną *in vitro* ekstraktu zawierającego aktywny czynnik HSF1 [105]. Wykazano również oddziaływanie aktywnej, trimerycznej formy HSF1 z białkiem Hsp70 [105]. Morimoto [15, 16, 105] zaproponował, że wiązania białka Hsp70 do HSF jest jednym z czynników utrzymujących HSF w nieaktywnej, monomerycznej formie. Podniesienie temperatury ponad wartość fizjologiczną prowadzi do pojawienia się zdenaturowanych lub też nieprawidłowo zwiniętych, nieaktywnych białek i kompleksów białkowych, konkurujących z HSF o wiązanie z Hsp70. Oddysocjowanie Hsp70 z kompleksu z HSF umożliwia jego trimeryzację i aktywuje zdolność wiązania do DNA, co w efekcie doprowadza do zwiększonej syntezy Hsp70 oraz innych białek szoku termicznego. Wzrost poziomu Hsp70 w komórce przywracałby oddziaływanie pomiędzy Hsp70 i HSF co mogłoby doprowadzać do inaktywacji HSF i wyłączenia odpowiedzi szoku termicznego.

## VIII. Podsumowanie

Odpowiedź szoku termicznego jest charakterystyczna dla wszystkich organizmów, a wzrost stężenia białek szoku termicznego zachodzi w wyniku podwyższenia transkrypcji genów szoku termicznego. Pomimo różnic w mechanizmie indukcji transkrypcji genów hsp pomiędzy komórkami eukariotycznymi a bakterią *E. coli* wydaje się, że rola białka Hsp 70 w negatywnej autoregulacji odpowiedzi szoku termicznego jest podobna w komórkach obu rodzajów. Dalsze badania roli białek Hsp70 w autoregulacji odpowiedzi szoku termicznego u eukariota, a szczególnie uwzględnienie w tych badaniach udziału ostatnio zidentyfikowanych eukariotycznych homologów białek DnaJ i GrpE [106, 107], powinny doprowadzić do pełnego zrozumienia roli Hsp 70 w modulacji aktywności trans-

krypcyjnej czynnika szoku termicznego.

## Podziękowanie

Praca finansowana w ramach grantu KBN 6P203 042 06.

Artykuł otrzymano 20 stycznia 1995 r.  
Zaakceptowano do druku 27 lutego 1995 r.

## Piśmiennictwo

1. Skowyrza D, Żylicz M (1987) *Post Biochem* **33**: 259-276
2. Lipińska B (1990) *Post Biochem* **36**: 32-42
3. Morimoto RI, Tissieres A, Georgopoulos C (1994) W: *The Biology of Heat Shock Proteins and Molecular Chaperones*, Cold Spring Harbor Laboratory Press
4. Neidhardt FC, VanBogolen RA (1987) W: Neidhardt FC, Ingraham IL, Low KB, Magasanik B, Schaechter M, Umberger HE (red) *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: Cellular and Molecular Biology, Am Soc Microbiol, Washington DC, str 1334-1345
5. Chuang SE, Daniels DL, Blattner FR (1993) *J Bacteriol* **175**: 2026-2036
6. Hendrick JP, Hartl FU (1993) *Annu Rev Biochem* **62**: 349-384
7. Georgopoulos C, Liberek K, Żylicz M, Ang D (1994) W: Morimoto RI, Tissieres A, Georgopoulos C (red) *The Biology of Heat Shock Protein and Molecular Chaperones*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, str 209-250
8. Georgopoulos C, Welch WJ (1993) *Annu Rev Cell Biol* **9**: 601-634
9. Lemaux PG, Herendeen SL, Bloch PL, Neidhardt FC (1978) *Cell* **13**: 427-434
10. Yamamori T, Ito K, Nakamura Y, Yura T (1978) *J Bacteriol* **134**: 1133-1140
11. Yamamori T, Yura T (1980) *J Bacteriol* **142**: 843-851
12. Herendeen SL, VanBogolen RA, Neidhardt FC (1979) *J Bacteriol* **139**: 185-194
13. Yura T, Nagai H, Mori H (1993) *Annu Rev Microbiol* **47**: 321-350
14. Bukau B (1993) *Mol Microbiol* **9**: 671-680
15. Morimoto RI (1993) *Science* **259**: 1409-1410
16. Morimoto RI, Sarge KD, Abravaya K (1992) *J Biol Chem* **267**: 21987-21989
17. Wu C, Clos J, Giorgi G, Haroun RI, Kim SJ, Rabindram SK, Westwood JT, Wiśniewski J, Yim G (1994) W: Morimoto RI, Tissieres A, Georgopoulos C (red) *The Biology of Heat Shock Protein and Molecular Chaperones*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, str 395-416
18. Morimoto RI, Jurivich DA, Kroeger PE, Mathur SK, Murphy SP, Nakai A, Sarge K, Abravaya K, Sistonen LT (1994) W: Morimoto RI, Tissieres A, Georgopoulos C (red) *The Biology of Heat Shock Protein and Molecular Chaperones*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, str 417-456
19. Lis J, Wu C (1993) *Cell* **74**: 1-4
20. Neidhardt FC, VanBogolen RA (1981) *Biochem Biophys Res Commun* **100**: 894-900
21. Yamamori T, Yura T (1982) *Proc Natl Acad Sci USA* **79**: 860-864
22. Grossman AD, Erickson JW, Gross CA (1984) *Cell* **38**: 383-390
23. Cowing DW, Bardwell JC, Craig EA, Woolford C, Hendrix RW, Gross CA (1985) *Proc Natl Acad Sci USA* **82**: 2679-2683
24. Zhou YN, Kusukawa N, Erickson JW, Gross CA, Yura T (1988) *J Bacteriol* **170**: 3640-3649
25. Baker TA, Grossman AD, Gross CA (1984) *Proc Natl Acad Sci USA* **81**: 6779-6783
26. Tsuchido T, VanBogelen RA, Neidhardt FC (1986) *Proc Natl Acad Sci USA* **83**: 6959-6963
27. Georgopoulos C, Ang D, Liberek K, Żylicz M (1990) W: Morimoto RI, Tissieres A, Georgopoulos C (red)

- Stress Proteins in Biology and Medicine, Cold Spring Harbor Laboratory Press, str 167-190
28. Kusukawa N, Yura T (1988) *Genes Dev* **2**: 874-882
  29. Taylor WE, Straus DB, Grossman AD, Burton ZF, Gross CA, Burgess R (1984) *Cell* **38**: 371-381
  30. Newlands JT, Gaal T, Meccus J, Gourse RL (1993) *J Bacteriol* **175**: 661-668
  31. Craig EA, Gross CA (1991) *Trends Bioch Sci* **16**: 135-140
  32. Straus DB, Walter WA, Gross CA (1987) *Nature (Lond)* **329**: 348-351
  33. Erickson JW, Vaughn V, Walter WA, Neidhardt FC, Gross CA (1987) *Genes Dev* **1**: 419-432
  34. Fujita N, Ishihama A (1987) *Mol Gen Genet* **210**: 5-9
  35. Nagai H, Yano R, Erickson JW, Yura T (1990) *J Bacteriol* **172**: 2710-2715
  36. Erickson JW, Gross CA (1989) *Genes Dev* **3**: 1462-1471
  37. Wang Q, Kaguni JM (1989) *J Biol Chem* **264**: 7338-7344
  38. Lipińska B, Sharma S, Georgopoulos C (1988) *Nucleic Acids Res* **16**: 10053-10067
  39. Lipińska B, Fayet O, Baird L, Georgopoulos C (1989) *J Bacteriol* **171**: 1574-1584
  40. Strauch KL, Johnson K, Beckwith J (1989) *J Bacteriol* **171**: 2689-2696
  41. Wang Q, Kaguni JM (1989) *J Bacteriol* **171**: 4248-4253
  42. Nagai H, Yuzawa H, Yura T (1991) *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 10515-10519
  43. Tilly K, Erickson J, Sharma S, Georgopoulos C (1986) *J Bacteriol* **168**: 1155-1158
  44. Kamath-Loeb AS, Gross CA (1991) *J Bacteriol* **173**: 3904-3906
  45. Sprengart ML, Fatscher HP, Fuchs E (1990) *Nucleic Acids Res* **18**: 1719-1723
  46. Shean CS, Gottesman ME (1992) *Cell* **70**: 513-522
  47. Faxen M, Plumbridge J, Isaksson LA (1991) *Nucleic Acids Res* **19**: 5247-5251
  48. Nagai H, Yuzawa H, Yura T (1991) *Biochimie* **73**: 1473-1479
  49. Yuzawa H, Nagai H, Mori H, Yura T (1993) *Nucleic Acids Res* **21**: 5449-5455
  50. Nagai H, Yuzawa H, Kanemori M, Yura T (1994) *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 10280-10284
  51. Grossman AD, Straus DB, Walter WA, Gross CA (1987) *Genes Dev* **1**: 179-184
  52. Straus DB, Walter WA, Gross CA (1990) *Genes Dev* **4**: 2202-2209
  53. Tilly K, Spence J, Georgopoulos C (1989) *J Bacteriol* **171**: 1585-1589
  54. Gross CA, Straus DB, Erickson JW, Yura T (1990) W: Morimoto RI, Tissieres A, Georgopoulos C (red) Stress Proteins in Biology and Medicine, Cold Spring Harbor Laboratory Press, str 167-190
  55. Sherman MY, Goldberg AL (1992) *EMBO J* **11**: 71-77
  56. Herman C, Ogura T, Tomoyasu T, Hiraga S, Akiyama Y, Ito K, Thomas R, D'Ari R, Boulloc P (1993) *Proc Natl Acad Sci USA* **90**: 10216, 10220
  57. Tilly K, McKittrick N, Żylicz M, Georgopoulos C (1983) *Cell* **34**: 641-646
  58. Bardwell JCA, Craig EA (1984) *Proc Natl Acad Sci USA* **81**: 848-852
  59. Ang D, Georgopoulos C (1989) *J Bacteriol* **171**: 2748-2755
  60. Phillips GJ, Silhavy TJ (1990) *Nature (Lond)* **344**: 882-884
  61. Wild J, Altman E, Yura T, Gross CA (1992) *Genes Dev* **6**: 1165-1172
  62. Sakakibara Y (1988) *J Bacteriol* **170**: 972-979
  63. Żylicz M, Ang D, Liberek K, Georgopoulos C (1989) *EMBO J* **8**: 1601-1608
  64. Mensa-Wilmot K, Seaby R, Alfano C, Wold MS, Gomes B, McMacken R (1989) *J Biol Chem* **264**: 2853-2861
  65. Wickner S, Hoskins J, Mckenney K (1991) *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 903-909
  66. Liberek K, Marszałek J, Ang D, Georgopoulos C, Żylicz M (1991) *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 2874-2878
  67. Skowrya D, Georgopoulos C, Żylicz M (1990) *Cell* **62**: 939-944
  68. Schroder H, Langer T, Hartl FU, Buku B (1993) *EMBO J* **12**: 4137-4144
  69. Ziemienowicz A, Skowrya D, Zeilstra J, Fayet O, Georgopoulos C, Żylicz M (1993) *J Biol Chem* **268**: 25425-25431
  70. Gamer J, Bujard H, Bukau B (1992) *Cell* **69**: 833-842
  71. Liberek K, Galitski TP, Żylicz M, Georgopoulos C (1992) *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 3516-3520
  72. Liberek K, Georgopoulos C (1993) *Proc Natl Acad Sci USA* **90**: 11019-11023
  73. Garvin LD, Hardies SC (1989) *Nucleic Acides Res* **17**: 4889
  74. Cellier MFM, Teyssier J, Nicolas M, Liautard JP, Marti J, Widada J (1992) *J Bacteriol* **174**: 8036-8042
  75. Karls RK, Jin DJ, Donohue TJ (1993) *J Bacteriol* **175**: 7629-7638
  76. Klein G, Walczak R, Krasnowska E, Błaszczak A, Lipińska B (1995) *Molec Microbiol w druku*
  77. Eaton T, Shearman C, Gasson H (1993) *J Gen Microbiol* **139**: 3253-3264
  78. Wetzstein M, Volker U, Dedio J, Lobau S, Zuber U, Schiesswohl M, Herget C, Hecker M, Schumann W (1992) *J Bacteriol* **174**: 3300-3310
  79. Wu C (1984) *Nature (Lond)* **309**: 229-234
  80. Wu C (1984) *Nature (Lond)* **311**: 81-84
  81. Parker SC, Topol J (1984) *Cell* **36**: 357-369
  82. Sorger PK, Nelson HCM (1989) *Cell* **59**: 807-813
  83. Jakobsen BK, Pelham HRB (1991) *EMBO J* **10**: 369-375
  84. Jurivich DA, Sistonen LT, Kroes RA, Morimoto RI (1992) *Science* **255**: 1243-1245
  85. Westwood JT, Clos J, Wu C (1991) *Nature (Lond)* **353**: 822-827
  86. Perisic O, Xiao H, Lis JT (1989) *Cell* **59**: 797-806
  87. Abravaya K, Philips B, Morimoto RI (1991) *Mol Cell Biol* **11**: 586-592
  88. Zimarino V, Tsai C, Wu C (1990) *Science* **249**: 546-549
  89. Xio H, Lis JT (1988) *Science* **239**: 1139-1142
  90. Amin J, Ananthan J, Voellmy (1988) *Moll Cell Biol* **8**: 3761-3769
  91. Wiederrecht G, Seto D, Parker CS (1988) *Cell* **54**: 841-853
  92. Clos J, Westwood JT, Becker PB, Wilson S, Lambert K, Wu C (1990) *Cell* **63**: 1085-1097
  93. Scharf KD, Rose S, Zott W, Schoff F, Nover L (1990) *EMBO J* **9**: 4495-4501
  94. Rabindran SK, Giorgi G, Clos J, Wu C (1991) *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 6906-6910
  95. Sarge K D, Zimarino V, Holm K, Wu C, Morimoto RI (1991) *Genes Dev* **5**: 1902-1911
  96. Schuetz TJ, Gallo GJ, Sheldon L, Tempst P, Kingston RE (1991) *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 6910-6915
  97. Nakai A, Morimoto RI (1993) *Moll Cell Biol* **13**: 1983-1997
  98. Theodorakis NG, Zand DJ, Kotzbauer PT, Williams GT, Morimoto RI (1989) *Mol Cell Biol* **9**: 3166-3173
  99. Sistonen L, Sarge K D, Phillips B, Abravaya K, Morimoto R (1992) *Mol Cell Biol* **12**: 4104-4111
  100. Baler R, Dahl G, Voellmy R (1993) *Mol Cell Biol* **13**: 2486- 2496
  101. Sarge K D, Murphy SP, Morimoto RI (1993) *Mol Cell Biol* **13**: 1392-1407
  102. Peteranderl R, Nelson HCM (1993) *Biochemistry* **13**: 12272-12276
  103. Rabindram SK, Haroun RI, Clos J, Wiśniewski J, Wu C (1993) *Science* **259**: 230-234
  104. DiDomenico BJ, Bugaisky GE, Lindquist S (1982) *Cell* **31**: 593-603
  105. Abravaya K, Myers MP, Murphy SP, Morimoto RI (1992) *Genes Dev* **6**: 1153-1164
  106. Bork S, Sander C, Valencia A, Bukau B (1992) *Trends Bioch Sci* **17**: 129
  107. Bollinger L, Deloche O, Glick BS, Georgopoulos C, Jenó P, Kronidou N, Horst N, Morishima N, Schatz G (1994) *EMBO J* **13**: 1998-2006

# Struktura i właściwości czynnika transkrypcyjnego IIIA *Xenopus laevis*

## Structure and properties of transcription IIIA from *Xenopus laevis*

ELIZA WYSZKO<sup>1</sup>  
MIROŚŁAWA Z. BARCISZEWSKA<sup>2</sup>

### Spis treści:

1. Wprowadzenie
2. Charakterystyka czynnika transkrypcyjnego IIIA *Xenopus laevis*
3. Oddziaływanie TF IIIA *Xenopus laevis* z genem 5S rRNA
4. Oddziaływanie TF IIIA *Xenopus laevis* z 5S rRNA
5. Czynniki transkrypcyjne typu TF IIIA z innych organizmów

**Wykaz stosowanych skrótów:** 5S rRNA — rybosomalny RNA o stałej sedymentacji 5S; TF IIIA — czynnik transkrypcyjny IIIA; ICR — wewnętrzny region promotorowy genu 5S rRNA (ang. *internal control region*); 7S RNP — kompleks TF IIIA/5S rRNA o stałej sedymentacji 7S (ang. *7S ribonucleoprotein particle*); pz — pary zasad; aa — aminokwas, m.cz — masa cząsteczkowa.

## I Wprowadzenie

W komórkach eukariotycznych transkrypcja genów w jądrze przebiega przy udziale trzech polimeraz RNA: pol I, pol II, pol III. Katalizują one wydłużanie

### Contents:

1. Introduction
2. Characterization of *Xenopus laevis* transcription factor IIIA
3. Interaction of *Xenopus laevis* TF IIIA with 5S rRNA gene
4. Interaction of *Xenopus laevis* TF IIIA with 5S rRNA
5. TF IIIA-type transcription factors from other sources

łańcucha RNA na matrycy DNA. Są to białka o dużej masie cząsteczkowej (np m.cz. pol III z drożdży — 650 kD) zbudowane z kilku polipeptydów. Polimerazy I, II i III różnią się strukturą, lokalizacją i funkcją w transkrypcji genomu jądrowego. Charakteryzują się też odmienną wrażliwością na  $\alpha$ -amanitynę, znany inhibitor procesu transkrypcji (Tab. 1). Polimeraza I RNA katalizuje transkrypcję genów rybosomalnych kwasów rybonukleinowych (18S, 5.8S, 28S rRNA). Polimeraza II bierze udział w transkrypcji genów kodujących białka (mRNA ang. *messenger RNA*), oraz niektórych genów niskocząsteczkowych jądrowych RNA (ang. *snRNA* – *small nuclear RNA*). Polimeraza

**Tabela 1.**

Charakterystyka polimeraz RNA eukariontów

Polimeraza	Lokalizacja	Udział w transkrypcji genów	Aktywność w obecności $\alpha$ -amanityny
pol I	jąderko	rRNA (18S, 5.8S, 28S)	niewrażliwa
pol II	nukleoplazma	mRNA S <sub>n</sub> RNA	inhibicja przy 10 <sup>-8</sup> M
pol III	nukleoplazma	tRNA, 5S rRNA, 7SL RNA	inhibicja przy 10 <sup>-6</sup> M

III katalizuje syntezę tRNA, 5S rRNA, wirusowych RNA i niektórych niskocząsteczkowych RNA (Tab. 2). Mechanizm transkrypcji wymaga swoistych białek,

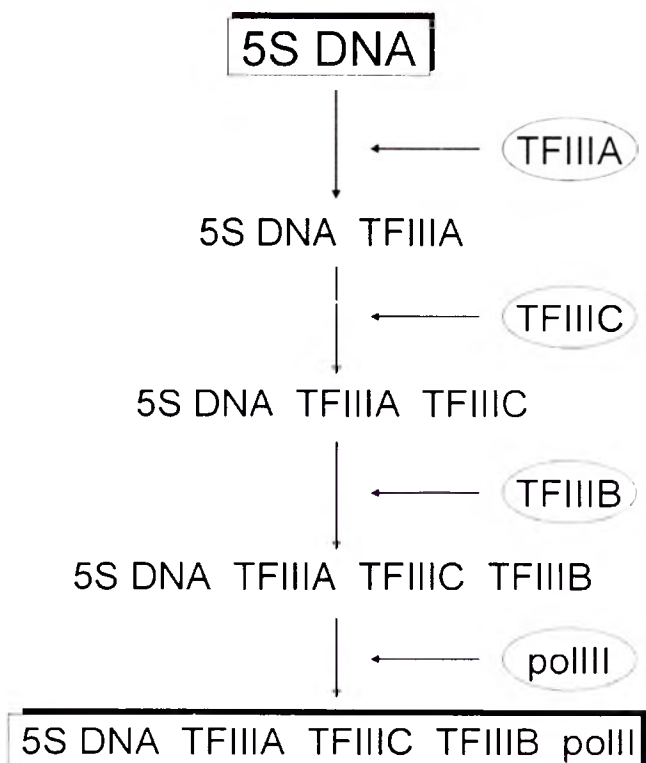
<sup>1</sup> Mgr, <sup>2</sup> doc. dr hab w Instytucie Chemii Bioorganicznej PAN, ul. Noskowskiego 12, 61-704 Poznań

**Tabela 2.**

Charakterystyka produktów transkrypcji genów przebiegającej z udziałem polimerazy III RNA [55]

Produkt	Właściwości	Źródło
tRNA	udział w syntezie białka, inne	wszystkie organizmy
5S rRNA	składnik dużej podjednostki rybosomu	wszystkie organizmy
U6 snRNA	udział w składaniu pre-mRNA ( <i>splicing</i> )	wszystkie organizmy
RNA RNazy P	udział w dojrzewaniu 5'-końca tRNA	człowiek, drożdże
RNA RNazy P	udział w tworzeniu starterów dla syntezy mitochondrialnego DNA	człowiek, szczur, mysz
RNA telomerazy	składnik telomerazy	<i>Tetrahymena</i>
7SL RNA	udział w translokacji białek	wszystkie organizmy
U3 snRNA	udział w dojrzewaniu pre-rRNA	rośliny
Y scRNA	składnik Ro scRNP	człowiek
7SK RNA	nieznana	człowiek
vRNA	nieznana	szczur, żaba
G8 RNA	nieznana	<i>Tetrahymena</i>
Ekson 1 Myc	nieznana	człowiek
VA RNA	udział w selektywnej translacji wirusowego RNA	adenowirus
EBER RNA	nieznana	Epstein-Barr Virus
HVP RNA	nieznana	Herpes Virus

tw. czynników transkrypcyjnych rozpoznających specyficzne sekwencje promotorowe genów. W przeciwieństwie do genów klasy I i II, których sekwencje promotorowe zlokalizowane są przed miejscem startu transkrypcji w niekodującym regionie 5', geny klasy III posiadają w większości promotory wewnętrzne (ang. *internal control region, ICR*), stanowiące część sekwencji kodującej. Składają się one z dwóch, oddalonych od siebie odcinków oligonukleotydowych (ang. *box*), rozdzielonych sekwencją łącznikową. W przypadku genów tRNA, 7SL i małych wirusowych RNA nazwane są one blokami A i B. Natomiast w genach 5S rRNA określane są jako bloki A i C ze względu na brak homologii pomiędzy sekwencjami fragmentów B i C. W transkrypcji genów 5S rRNA *Xenopus laevis* uczestniczą trzy czynniki transkrypcyjne IIIA, IIIB i IIIC. Ich nazwy odzwierciedlają kolejność wypływu białka z kolumny wypełnionej fosfocelulozą [1]. Czynniki TF IIIA i TF IIIC wpływają na stabilność kompleksu transkrypcyjnego [2], natomiast TF IIIB umożliwia swoiste oddziaływanie polimerazy III z genem [3] (Ryc. 1). Pierwszym i jak dotychczas najlepiej poznany eukariotycznym czynnikiem transkrypcyjnym jest TF IIIA żaby szponiastej *Xenopus laevis* (TF IIIA X.1.). Znana jest sekwencja genu kodującego TF IIIA [4] oraz jego sekwencja aminokwasowa. Na podstawie charakterystycznego ułożenia cystein i histydyn zasugerowano w 1985 r. istnienie nieznanego wówczas elementu budowy białek tzw. palca cynkowego, odpowiedzialnego za wiązanie kwasów nukleinowych [5]. Wykazano jego zdolność do wiązania DNA jako czynnika transkrypcyjnego oraz niezwykle rzadką właściwość tworzenia kompleksów z 5S rRNA. Jest to jedno z nielicznych białek oddziałujących zarówno z DNA jak i RNA. Innymi białkami należącymi do tej grupy są np. T4 DNA polimeraza, kluczowe białko replikacji fagowego DNA, rozpoznające również selektywnie mRNA oraz białko jądrowe oczyszczone z ko-



Ryc. 1. Schemat tworzenia aktywnego kompleksu transkrypcyjnego genu 5S rRNA.

mórek HeLa, hnRNP-U/SAF-A oddziałujące z jednociowym DNA i syntetycznymi homorybopolinukleotydami [6, 7]. Podobnie białko EBER1 wirusa EBV pełni istotną funkcję w replikacji DNA wirusa i oddziałuje z RNA między innymi z elementem TAR wirusa HIV [8].

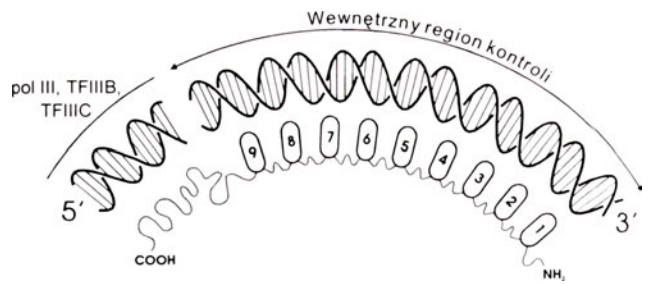
## II. Charakterystyka czynnika transkrypcyjnego IIIA *Xenopus laevis*

W genomie *Xenopus laevis* występują dwie rodziny genów 5S rRNA, które ulegają ekspresji na różnych

etapach rozwoju. Są to oocytowo specyficzne geny 5S rRNA (20.000 kopii/haploidalny genom) oraz grupa somatycznych genów 5S rRNA (400 kopii/haploidalny genom). Geny te ulegają ekspresji w oocytach, natomiast w komórkach somatycznych syntetyzowany jest tylko somatyczny 5S rRNA. Początkowo, wysoki poziom transkrypcji oocytowego 5S rRNA stopniowo maleje w trakcie oogenezy. Efekt ten próbowano tłumaczyć obniżeniem stabilności kompleksu transkrypcyjnego oocytowego genu 5S rRNA lub też malejącym stężeniem czynnika transkrypcyjnego IIIA w oocytach. Obecnie znane są inne dowody wskazujące, że histon H1 jest odpowiedzialny za zróżnicowaną ekspresję genów 5S rRNA u *Xenopus*. Białko to tworząc kompleksy z DNA modyfikuje strukturę nukleosomu i w ten sposób uniemożliwia transkrypcję oocytowych genów 5S rRNA. Histon H1 wykazuje preferencję do sekwencji nukleotydowych bogatych w A+T. Sekwencje oskrzydłające oocytowe geny 5S rRNA charakteryzują się wysoką zawartością A+T ok. 76%. Taki mechanizm transkrypcji 5S rRNA potwierdza również fakt, że podczas wczesnych stadiów rozwojowych *Xenopus* nie znaleziono histonu H1 w chromatynie. Wydaje się oczywiste, że histony wywierają decydujący wpływ na transkrypcję. Niezależnie od stężenia czynników transkrypcyjnych w chromatynie histon H1 hamuje transkrypcję oocytowych genów 5S rRNA [9-11].

Okazało się, że u żaby szponiastej istnieją dwie formy TF IIIA: oocytowa (O-TF IIIA) oraz somatyczna (S-TF IIIA). Białko specyficzne dla oocytów aktywuje transkrypcję oocytowego 5S rRNA podczas całego procesu oogenezy. We wczesnym jej etapie w komórce znajduje się  $10^{12}$  cząsteczek TF IIIA, co stanowi około 10% wszystkich białek. Poprzez oddziaływanie z 5S rRNA, TF IIIA zapewnia także akumulację tej cząsteczki w postaci 7S RNP [12, 13]. Niski poziom transkrypcji somatycznego 5S rRNA w embrionach i dojrziałych tkankach odpowiada niewielkiemu stężeniu S-TF IIIA w komórkach. Białko to ma identyczne właściwości immunologiczne z O-TF IIIA, lecz jego masa cząsteczkowa jest o 2000 daltonów większa. Oba polipeptydy kodowane są przez ten sam gen, a różnica w wielkości tych białek jest spowodowana rozpoczęciem translacji O- i S-TF IIIA z dwóch miejsc inicjacji oddalonych od siebie o 66 nukleotydów [14]. Dodatkowe 22 aminokwasy przy końcu aminowym białka nie wpływają na jego oddziaływanie z 5S rRNA czy 5S DNA. Podobny sposób regulacji ekspresji genów opisano dla genu amylazy ssaków [15]. Z badań genomowego DNA *Xenopus laevis* wynika, że gen kodujący TF IIIA występuje w jednej kopii na haploidalny genom [4].

TF IIIA *Xenopus laevis* jest białkiem monomerycznym o m.c. około 40 kD, zbudowanym z 344 aminokwasów. Można w nim wyróżnić dwie domeny: jedna przy końcu aminowym (domena N), decydująca o specyficznym oddziaływaniu z kwasami nukleinowymi



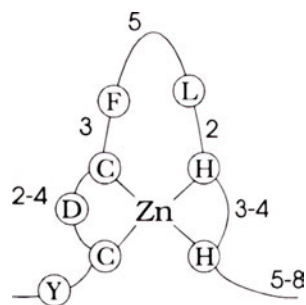
Ryc. 2. Schemat przedstawiający oddziaływanie TF IIIA z DNA.

i druga przy końcu karboksylowym (domena C), która bierze udział w aktywacji transkrypcyjnej genu 5S rRNA rozpoznając inne składniki kompleksu transkrypcyjnego. Jest ona zaangażowana w bezpośrednie oddziaływanie z czynnikiem transkrypcyjnym IIIIC, który bez TF IIIA nie wiąże się z genem 5S rRNA [2, 5] (Ryc. 2). W domenie N TF IIIA, pomiędzy aminokwasami 13-276, znajduje się dziewięć podobnych odcinków o długości około 30 aminokwasów, tworzących tzw. palce cynkowe, w których występują charakterystycznie powtarzające się pary cystein i histydyn (Ryc. 3). Cząsteczka TF IIIA może związać 7-11 kationów cynku [5]. Każdy jon cynku koordynowany jest przez dwie histydyny i dwie cysteiny ( $Cys_2His_2$ ). W oddziaływaniach te zaangażowane są atomy azotu grup imidazolowych histydyn oraz atomy siarki grup tiolowych cystein [16].

TF IIIA zawiera 9 palców cynkowych typu  $Cys_2His_2$  o uogólnionej sekwencji aminokwasowej: (Tyr, Phe)-X-Cys- $X_{2-4}$ -Cys- $X_3$ -Phe- $X_5$ -Leu- $X_2$ -His- $X_{3-4}$ -His- $X_{2-6}$ , gdzie X może być dowolnym aminokwasem [5, 17] (Ryc. 4). Palce cynkowe połączone są krótkimi sekwencjami łącznikowymi o długości 5-8 aminokwasów. W TF IIIA mają one różny skład aminokwasowy z wyjątkiem dwóch o sekwencji Thr-Gly-Glu-Lys (TGEK), występujących między trzema pierwszymi palcami. Przypisuje się im specyfi-

1	8	13	17	23	26	30	
M G E K A L P V V Y K R							12
1	Y I C S F A D C G G A A Y N K N W K L D * A H L C * K H	37					
2	T G E K * P F P C K E E G C E K G F T S L H H L T * R H S L * T H	67					
3	T G E K * N F T C D S D G C D L R F T T K A N M K * K H F N R F H	98					
4	N I K I C V Y V C H F E N C G K A F K K H N Q L K * V H Q F * S H	129					
5	T Q Q L * P Y E C P H E G C D K R F S L P S R L K * R H E K * V H	159					
6	A G - - * - Y P C K K D D S C S F V G K T W T L Y L K H V A E C H	188					
7	Q D - - * L A V C - - D V C N R K F R H K D Y L R * D H Q K * T H	214					
8	E K E R T V Y L C P R D G C D R S Y T T A F N L R * S H I Q S F H	246					
9	E E Q R * P F V C E H A G C G K C F A H K K S L E * R H S V * V H	276					
D P E K R K L K E K C P R P K R S L A S R L T G Y I P P K S K E K N A							311
S V S G T E K T D S L V K N K P S G T E T N G S L V L D K L T I O							344

Ryc. 3. Sekwencja aminokwasowa czynnika transkrypcyjnego IIIA z oocytów *Xenopus laevis*. Regiony powtarzające się są ponumerowane 1-9 po lewej stronie ryciny, numery po prawej stronie oznaczają kolejność aminokwasów. Stałe aminokwasy zaznaczone są kółkami, zmienne pozycje są oznaczone gwiazdkami, a miejsca wolne w sekwencji kreskami. Numeracja nad ryciną odnosi się do pozycji aminokwasów w domenach palców cynkowych.



(Tyr, Phe)-X-Cys-X<sub>2,4</sub>-Cys-X<sub>3</sub>-Phe-X<sub>5</sub>-Leu-X<sub>2</sub>-His-X<sub>3,4</sub>-His-X<sub>2,6</sub>

**Ryc. 4.** Schemat struktury palców cynkowych TF IIIA przedstawiający pętlę utworzoną wokół tetraedrycznie związanego kationu cynku, gdzie kółkami zaznaczone są stałe aminokwasy Cys, His, Tyr, Asp, Phe, Leu.

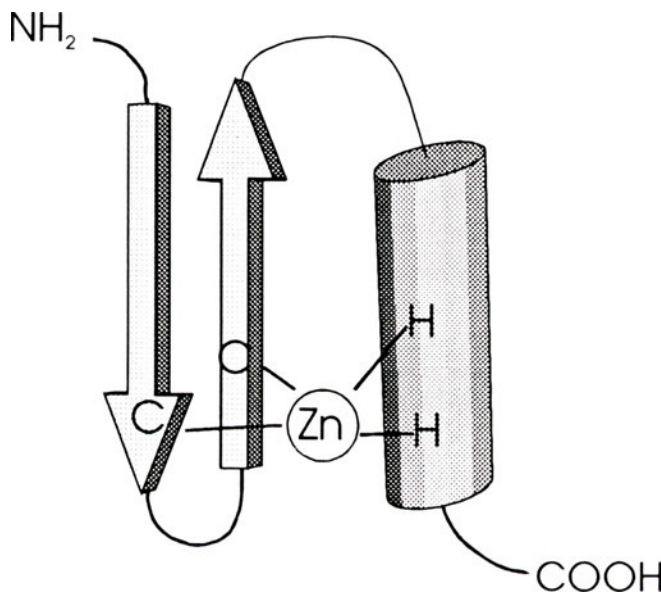
czny udział w oddziaływaniach z DNA w dużej bruździe [18].

Analiza struktury wielu później poznanych białek pozwoliła na wyróżnienie kilku innych typów palców cynkowych (Tab. 3). Należą do nich oprócz Cys<sub>2</sub>His<sub>2</sub>, także Cys<sub>2</sub>Cys<sub>2</sub>, Cys<sub>6</sub>, Cys<sub>3</sub>HisCys<sub>4</sub>, Cys<sub>2</sub>HisCys. Różnią się one głównie liczbą cystein lub histydyn zaangażowanych w wiązanie cynku. Palce cynkowe są stałym elementem strukturalnym eukariotycznych białek regulatorowych np. Sp1, receptorów hormonów sterydowych, białka Krüppel, ADR1, czy Krox-20.

Na podstawie widm magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR) stwierdzono, że palce cynkowe zbudowane są z helisy  $\alpha$ , w której znajdują się dwie histydyny oraz z ułożonej antyrównolegle struktury daszkowej ( $\beta$ ) zawierającej dwie cysteiny. Struktura tego motywu utrzymywana jest przez kation cynku związany koordynacyjnie z tymi aminokwasami (Ryc.5) [19].

### III. Oddziaływanie TF IIIA *Xenopus laevis* z genem 5S rRNA

TF IIIA inicjuje tworzenie kompleksu transkrypcyjnego w wyniku specyficznego wiązania z fragmentem genu strukturalnego określanym jako wewnętrzny region kontroli (ang. *internal control region*, ICR). Topografię oddziaływania TF IIIA z ICR badano za pomocą ograniczonej hydrolizy nukleazami, dichroizmu kołowego (CD), spektroskopii NMR, oraz analizy rentgenograficznej kompleksów białka z dwuniciowymi oligonukleotydami. Pokazano, że czynnik transkrypcyjny IIIA oddziałuje z fragmentem około 50 par zasad w regionie promotorowym. Za pomocą hydrolizy kompleksu DNA/TF IIIA DNazą I wykazano, że



**Ryc. 5.** Schemat trzeciorzędowej struktury palca cynkowego typu Cys<sub>2</sub>His<sub>2</sub> (opis patrz tekst).

**Tabela 3.**

Typy palców cynkowych [56]

Typ palca cynkowego	Białko	Właściwości
Cys <sub>2</sub> His <sub>2</sub>	ADR1	Regulacja syntezy dehydrogenazy alkoholowej u drożdży (2 palce cynkowe).
	ATBF1	Czynnik wiążący sekwencje enhancerowe bogate w pary A-T genu $\alpha$ -fetoproteiny ludzkiej (17 palców cynkowych).
	Evi-1	Produkt protoonkogenu <i>Evi-1</i> (10 palców cynkowych).
	hunchback (hb)	Produkt genu <i>hunchback</i> regulującego segmentację u <i>Drosophila</i> .
	Krüppel (Kr)	Produkt genu Krüppel regulującego segmentację u <i>Drosophila</i> .
	Krox-20 (ERG2)	Produkt genu wczesnej odpowiedzi na sygnały mitogenne i stymulujące różnicowanie (3 palce cynkowe).
	Sp1	Czynnik transkrypcyjny wiążący sekwencje bogate w G (GC-boxes) (3 palce cynkowe).
Cys <sub>2</sub> HisCys	TFIIIA	Czynnik transkrypcyjny genów 5S rRNA (9 palców cynkowych).
	ZFY	Udział w spermatogenezie i rozwoju embrionalnym (kodowany przez chromosom Y) (13 palców cynkowych).
Cys <sub>2</sub> Cys <sub>2</sub>	NCP	Białko nukleokapsydu retrowirusów uczestniczące w tworzeniu dimerów genomu wirusowego oraz inicjacji odwrotnej transkrypcji.
Cys <sub>6</sub>	GR	Receptor glukokortykoidu.
	ER	Receptor estrogenu.
Cys <sub>3</sub> HisCys <sub>4</sub>	GAL4	Drożdżowy czynnik regulujący ekspresję genów kodujących enzymy metabolizujące galaktozę.
	bmi-1	Produkt genu <i>bmi-1</i> Mo-MuLV (Moloney Murine Leukemia Virus).

są to nukleotydy 45-95 nici kodującej i nukleotydy 45-97 nici niekodującej. Nić kodująca DNA w obrębie miejsca wiązania TF IIIA jest prawie całkowicie osłaniana przez białko, natomiast na nici niekodującej występują 2 krótkie regiony, trawione DNazą I oraz 3 fragmenty osłaniane przez TF IIIA. Są to nukleotydy 49-58 (box A), 65-71 (łącznik-I) oraz, 78-88 (box C) regionu promotorowego [20]. Palec cynkowy 9 znajduje się przy końcu karboksylowym wiąże się przy końcu 5' ICR (box A), a palec cynkowy 1 znajdujący się przy końcu aminowym oddziałuje z DNA przy końcu 3' ICR (box C) [5, 21].

Widma CD wskazują, że DNA w miejscu wiązania z TF IIIA przyjmuje konformację pośrednią pomiędzy formami A i B DNA [22].

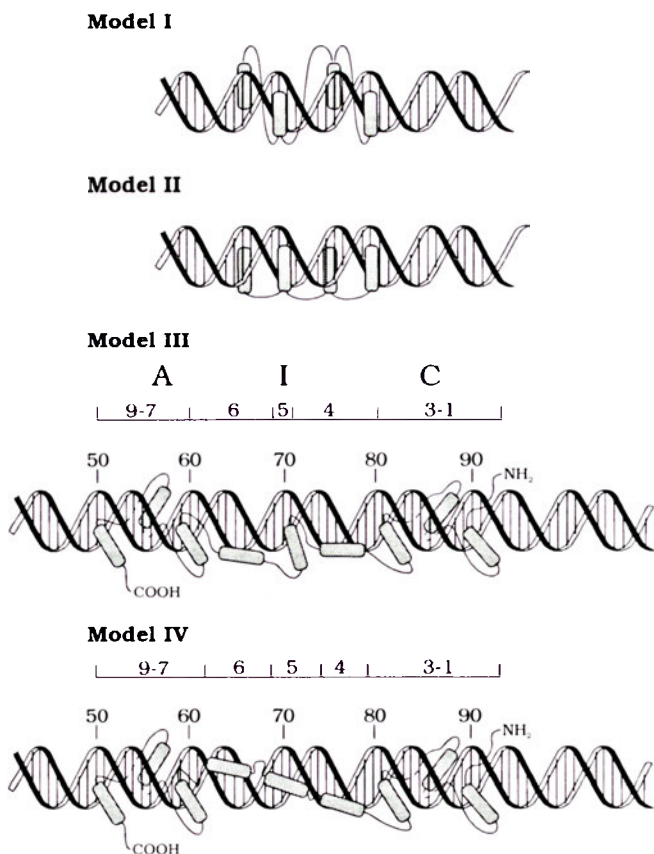
W oparciu o zaobserwowaną okresowość sekwencji DNA (X-C-X-G-G-X-Py-X-G-G-Pu) oraz powtarzające się elementy struktury białka (palec cynkowe) zaproponowano modele budowy przestrzennej kompleksu TF IIIA z DNA (Ryc. 6). Model I (Ryc. 6a) zakłada, że TF IIIA oplata helisę DNA I, a każdy palec cynkowy oddziałuje z 5 parami zasad w dużej bruzdzie DNA I. W modelu II (Ryc. 6b) białko ułożone jest równoległe do osi helisy DNA, a poszczególne palce cynkowe oddziałują z guanozynami znajdującymi się po przeciwnych stronach helisy w dużej bruzdzie DNA [23]. Na poparcie modelu II wskazują wyniki hydrolizy nukleazami kompleksu TF IIIA/5S DNA. Tylko jedna strona helisy jest dostępna dla enzymów i czynników modyfikujących podczas gdy druga jest osłaniana przez białko [23]. W modelu III (Ryc. 6c) palce

cynkowe 1-3 wiążą się z blokiem C (box C) promotora w dużej bruzdzie DNA. Wykazano, że 90% energii wiązania 5S DNA z TF IIIA pochodzi właśnie z oddziaływań 3 pierwszych palców cynkowych [24], a usunięcie pozostałych 6 palców cynkowych nie zmienia zasadniczo specyficzności wiązania białka z DNA [20]. Usunięcie fragmentu ICR od 80 do 97 nukleotydu całkowicie hamuje tworzenie kompleksu TF IIIA z genem 5S rRNA. Mutacje nukleotydów w pozycjach 81, 85, 86, 89 i 91 w znaczący sposób redukują zdolność oddziaływania TF IIIA z genem 5S rRNA [25]. Palce 7-9 wiążą się z blokiem A (box A) w dużej bruzdzie promotora, palec 5 wiąże się z sekwencją łącznikową (I) w dużej bruzdzie natomiast palce 4 i 6 układają się w poprzek małej bruzdy łączącej poszczególne bloki promotora [26, 27]. Delecje tych fragmentów ICR nie wywołują podobnego efektu jak usunięcie bloku C, a jedynie ograniczone oddziaływanie obu składników kompleksu [28]. Model IV (Ryc. 6d) opiera się na założeniu, że kompleks TF IIIA/5S DNA nie ma stałej symetrii. Występują w nim 2 typy oddziaływań palców cynkowych z DNA; skrajne palce cynkowe (1-3, 7-9) oplatają helisę DNA, natomiast wewnętrzne palce (4-6) ułożone są wzdłuż osi helisy DNA [29].

Rozwiązanie struktury kryształu kompleksu Zif268/DNA pozwoliło dokładnie poznać mechanizm oddziaływania palców cynkowych typu Cys<sub>2</sub>His<sub>2</sub> z DNA. Białko wyizolowane z myszy, Zif 268 oplata DNA wzdłuż dużej bruzdy. Helisy  $\alpha$  każdego z trzech palców cynkowych tego polipeptydu oddziałują z trzema parami zasad w dużej bruzdzie formy B DNA [30, 31], poprzez tworzenie wiązań wodorowych pomiędzy łańcuchami bocznymi arginin i guaninami. Natomiast łańcuchy boczne arginin, histydyn i seryn pochodzące ze struktury  $\beta$  palców cynkowych oddziałują z łańcuchem fosforanowo-cukrowym DNA. Palec cynkowy znajdujący się przy końcu karboksylowym Zif 268 oddziałuje z DNA przy końcu 5', natomiast z regionem 3' DNA oddziałuje palec cynkowy przy końcu aminowym [31]. Ponieważ Zif 268 ma dużą homologię do sekwencji aminokwasowej trzech pierwszych palców cynkowych TF IIIA *Xenopus laevis*, można przypuszczać, że ich oddziaływania z 5S DNA są bardzo podobne.

#### IV. Oddziaływanie TF IIIA *Xenopus laevis* z 5S rRNA

Jak już wspomniano wcześniej TF IIIA oddziałuje specyficznie nie tylko z genem 5S rRNA ale również z produktem jego transkrypcji tworząc kompleks białkowo-nukleinowy (RNP) o stałej sedymentacji 7S. Występuje on w dużych ilościach w niedojrzałych oocytach [32]. Kompleks ten jest prawdopodobnie formą przechowywania 5S rRNA, aż do momentu utworzenia rybosomu [12, 13]. TF IIIA wiąże 5S DNA i 5S rRNA ze zbliżonym powinowactwem, a stała



Ryc. 6. Modele oddziaływania TF IIIA z DNA. (opis patrz tekst)



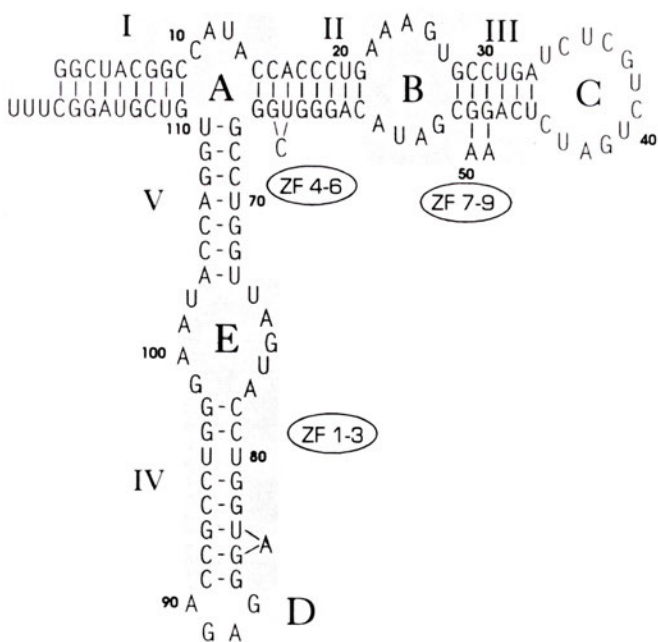
dysocjacji kompleksu ( $K_d$ ) wynosi około 1 nM [32]. Część cząsteczki 7S RNP zawiera 2 silnie związane kationy cynku, których nie można usunąć przy pomocy EDTA [33]. Z wyników ograniczonej hydrolizy kompleksu TF IIIA/5S rRNA rybonukleazami wynika, że TF IIIA oddziałuje z dwiema domenami RNA utworzonymi przez: helisę II/pętlę B i helisę IV/pętlę E/helisę V [34]. Przy czym silniejsze oddziaływanie zaobserwowano bliżej końca 5' miejsca wiązania TF IIIA z 5S rRNA, natomiast w przypadku 5S DNA silniejsze wiązanie wykazano dla 3'-końcowego fragmentu ICR [24, 35]. Wiele danych wskazuje, że helisa II i pętla B 5S rRNA są głównym regionem oddziaływań z TF IIIA [34]. 5S rRNA z kielków pszenicy, somatyczny 5S rRNA *Xenopus laevis* i mutanty oocytowego 5S rRNA *Xenopus laevis*, posiadające pętlę B o sekwencji identycznej z somatycznym 5S rRNA, wykazują większe powinowactwo do TF IIIA niż oocytowy 5S rRNA dzikiego typu [34, 36]. Zauważono, że delecje wypętlonych nukleotydów (A49, A50, C63 w helisie II i A83 w helisie IV) 5S rRNA nie mają zdecydowanego wpływu na ich wiązanie do TF IIIA [37]. Mutacje w pętlach C, D i E również nie zmieniają siły wiązania TF IIIA z 5S rRNA. Świadczy to o tym, że konserwatywne nukleotydy oraz konformacja tych regionów nie są warunkiem wystarczającym dla rozpoznawania RNA przez TF IIIA. Inni autorzy utrzymują, że fragmenty helikalne (I, III, V) 5S rRNA są niezbędne dla tworzenia specyficznych oddziaływań z TF IIIA [38]. Sekwencja CCUGG występująca w dwóch kopiach rozdzielonych 11 nukleotydami w helisach IV i V nie jest istotna dla wiązania TF IIIA z 5S rRNA pomimo, dużej roli tych nukleotydów w ICR genu 5S rRNA [39-42]. Wydaje się jednak, że struktura helisy II i V jest krytyczna dla wiązania TF IIIA i niezależnie od sekwencji region ten jest elementem rozpoznawanym przez białko [40].

Interesujący efekt zaobserwowano po wprowadzeniu mutacji w pętli A 5S rRNA. Stanowi ona kluczowe miejsce w strukturze 5S rRNA będąc miejscem rozgałęzienia dwóch głównych domen cząsteczki [43]. Zauważono, że mutacje w tym regionie wywołują zmiany w strukturze 5S rRNA redukując jego powinowactwo do TF IIIA [43].

Z dotychczasowej analizy mutantów 5S rRNA oraz fragmentów TF IIIA wynika, że palce cynkowe 1, 2 i 3 oddziałują z helisą IV, palce 4, 5 i 6 z helisą I, II i V, a palce cynkowe 7, 8 i 9 z helisą III (Ryc. 7). Wydaje się, że specyficzność wiązania warunkują środkowe palce TF IIIA tj. 4, 5 i 6. Szósty palec cynkowy odgrywa szczególną rolę lokując się w rejonie pętli A łączącej helisy I, II i V [44]. Natomiast usunięcie palców cynkowych 8 i 9 nie zmienia oddziaływań z 5S rRNA [24, 45]. Wydaje się, że TF IIIA w inny sposób rozpoznaje 5S rRNA i gen 5S rRNA.

Badając oddziaływanie TF IIIA *Xenopus laevis* z 5S rRNA różnych organizmów eukariotycznych, eubakteryjnych i archebakteryjnych wykazano, że elementy struktury 5S rRNA (w tym również trzeciorzędowa

struktura 5S rRNA), a nie homologia sekwencji są istotne w oddziaływaniach 5S rRNA z TF IIIA [34, 36, 46].



Ryc. 7. Struktura drugorzędowa 5S rRNA oocytów *Xenopus laevis*. Cyframi rzymskimi (I-V) oznaczone są helisy, literami (A-E) pętle. Ponadto zaznaczono region oddziaływania 5S rRNA z TF IIIA na szaro, oraz rozmieszczenie kolejnych palców cynkowych TF IIIA *Xenopus laevis* ZF 1-9 (ZF — ang. *hinc finger*) podczas tworzenia kompleksu z 5S rRNA.

## V. Czynniki transkrypcyjne typu TF IIIA z innych organizmów

Z porównania sekwencji aminokwasowych TF IIIA różnych organizmów wynika, że czynnik transkrypcyjny typu TF IIIA nie jest białkiem konserwatywnym (Tab. 4). Podobieństwo białek *Xenopus laevis* i *Xenopus borealis* wynosi 84%, a *Xenopus laevis* i *Rana catesbeiana* — 63% [47]. TF IIIA rodzajów *Xenopus* i *Rana* różnią się głównie sekwencją aminokwasową domen C, inne są ich właściwości immunologiczne i zdolność wiązania promotora 5S rRNA przez te białka [47, 48].

Z *Saccharomyces cerevisiae* wyizolowano gen kodujący TF IIIA (Tab. 5). Białko o m.c. 51 kD otrzymane *in vitro* wiąże specyficznie ICR drożdżowego genu 5S rRNA. Natywne białko z drożdży, obserwuje się na żelach poliakrylamidowych z SDS w postaci dwóch pasm odpowiadających masie cząsteczkowej 51 kD i 48 kD. Różnice w wielkości między nimi mogą być wynikiem potranslacyjnej modyfikacji lub częściowej proteolizy białka. Gen TF IIIA *Saccharomyces cerevisiae* występuje w jednej kopii i pozbawiony jest intronów w przeciwieństwie do genu TF IIIA *Xenopus laevis*, który zawiera 8 intronów. Czynniki transkrypcyjne IIIA drożdży i *Xenopus laevis* różnią się znacznie między sobą. TF IIIA *Saccharomyces cerevisiae* ma domenę N większą niż TF IIIA *Xenopus laevis*. Oba czynniki transkrypcyjne mają 9 palców cynkowych, z tym, że odległości między Cys-Cys, His-His i His-Cys

**Tabela 4.**Porównanie właściwości TF IIIA rodzajów *Xenopus* i *Rana*

Źródło TF IIIA	Wielkość	Tworzenie 7S RNP	Wiązanie przeciwciała dla TF IIIA X.I.	Tworzenie kompleksu z genem 5S rRNA X.I.	Stymulacja transkrypcji genu 5S rRNA X.b. <i>in vitro</i>
<i>Xenopus laevis</i>	~ 40 kDa	+	++	++	++
<i>Xenopus borealis</i>	~ 40 kDa	+	+/-	++	++
<i>Rana catesbeiana</i>	~ 40 kDa	+	-	++	+
<i>Rana pipiens</i>	~ 40 kDa	+	-	++	+

nie są takie same. Ponadto, w drożdżowym TF IIIA między palcem 8 i 9 występuje 81-aminokwasowy fragment o nieznannej jak dotychczas funkcji. Różnice w składzie aminokwasowym i wielkości dotyczą także domen C tych białek, warunkujących ich właściwości transkrypcyjne TF IIIA *Saccharomyces cerevisiae* nie oddziałuje z genem 5S rRNA *Xenopus laevis*, natomiast TF IIIA *Xenopus laevis* charakteryzuje się 100-1000 razy słabszym powinowactwem do genu 5S rRNA drożdży [49, 50].

mów wyższych. Te białka poprzez specyficzne oddziaływania z kwasami nukleinowymi pełnią istotne funkcje regulatorowe w komórkach. Przypuszcza się, że pochodzą one od pierwotnego peptydu zawierającego tylko jeden palec cynkowy, który został zwielokrotniony na drodze rearanżacji genów. Duża ilość palców cynkowych powinna wpływać na większą specyficzność w rozpoznawaniu kwasów nukleinowych. Układy transkrypcyjne, w których zaangażowane są czynniki białkowe mogą rozpoznawać bardzo dużą liczbę

**Tabela 5.**Porównywanie właściwości TF IIIA *Xenopus laevis*, *Saccharomyces cerevisiae*

Właściwości	TF IIIA <i>X. laevis</i>	TF IIIA <i>S. cerevisiae</i>	TF IIIA HeLa
wielkość białka (kD)	40	51 (48)	35, 42
ilość palców cynkowych	9	9	9
tworzenie kompleksu z genem 5S rRNA	+	+	+
stymulacja transkrypcji genu 5S rRNA	+	+	+
wiązanie 5S rRNA	+	?	+
wielkość genu (pz)	1500	1800	?
ilość intronów	8	-	?
ilość kopii/haploidalny genom	1	1	?
identyczność poszczególnych palców cynkowych	20-40%	20-40%	?
wielkość domeny N (przed pierwszym palcem cynkowym)	12 aa	48 aa	?
wielkość domeny C	70 aa	35 aa	?
odległości między cysteinami	4 aa	2 aa	?
odległości między histydynami	3 aa	4 aa	?
łącznik TGEK	+	-	?
wiązanie heterologicznego genu 5S rRNA	0.1-1%*	-	+**
reakcja z przeciwciałami dla TF IIIA X.I.	+	-	+***

\* — wiązanie genu 5S rRNA *S. cerevisiae* w stosunku do genu z *X. laevis*;\*\* — wiązanie genu 5S rRNA *S. cerevisiae* i *X. laevis* przez białko 42 kD

\*\*\* — dotyczy białka 42 kD

Z komórek HeLa wyodrębniono TF IIIA o wielkości 42 kD, który stymuluje transkrypcję genu 5S rRNA *in vitro* i oddziałuje z przeciwciałami dla TF IIIA *Xenopus laevis*. Białko to zawiera 9 palców cynkowych podobnie jak TF IIIA *Xenopus laevis* i *Saccharomyces cerevisiae* [51]. Wcześniej z tego samego źródła wyizolowano białko o wielkości 35 kD, wykazujące zdolność do wiązania 5S rRNA i 5S rDNA. Dla utrzymania jego aktywności konieczna jest obecność cynku, co wskazuje na możliwość występowania w nim palców cynkowych [52, 53].

Białka zawierające palce cynkowe wykryto tylko w organizmach eukariotycznych i można przyjąć, że jest to ich unikalną cechą, istotną w ewolucji organiz-

specyficznych miejsc wiązania na DNA przez losowe łączenie elementów wiążących DNA dając organizmom większą przewagę selekcyjną [54].

Artykuł otrzymano 2 listopada 1994 r.  
Zaakceptowano do druku 15 marca 1995 r.

## Piśmiennictwo

- Engelke DR, Ng S-Y, Shastry BS, Roeder RG (1980) *Cell* 19: 717-728
- Hayes J, Tullius TD, Wolfte AP (1989) *J Biol Chem* 264: 6009-6012
- Kassavetis GA, Braun BR, Nguyen LH, Geiduschek EP (1990) *Cell* 60: 235-245

4. Ginsberg AM, King BO, Roeder RG (1984) *Cell* **39**: 479-489
5. Miller J, McLachlan AD, Klug A (1985) *EMBO J* **4**: 1609-1614
6. Pavlov AR, Karam JD (1994) *J Biol Chem* **269**: 12968-12972
7. Fackelmayer FO, Dahm K, Renz A, Ramsperger V, Richter A (1994) *Eur J Biochem* **221**: 749-757
8. Snudden DK, Hearing J, Smith PR, Grasser FA, Griffin BE (1994) *EMBO J* **13**: 4840-4847
9. Kandolf H (1994) *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 7257-7261
10. Jerzmanowski A, Cole RD (1990) *J Biol Chem* **265**: 10726-10732
11. Bouvent P, Dimitrov S (1994) *Genes and Development* **8**: 1147-1159
12. Millstein L, Eversole-Cire P, Blanco J, Gottesfeld JM (1987) *J Biol Chem* **262**: 17100-17110
13. Andrews MT, Brown DD (1987) *Cell* **51**: 445-453
14. Kim SH, Darby MK, Joho KE, Brown DD (1990) *Genes and Development* **4**: 1602-1610
15. Schibler U, Sierra F (1987) *Ann Rev Genet* **21**: 237-57
16. Berg JM (1989) *Prog Inorg Chem* **37**: 143-155
17. Rhodes D, Klug A (1988) *Nucleic Acids and Molecular Biology* Ed by Eckstein F, Lilley DMJ Edyt. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, **2**: 149-166
18. Smith JF, Hawkins J, Leonard RE, Hanas JS (1991) *Nucleic Acids Res* **19**: 6871-6876
19. Berg JM (1988) *Proc Natl Acad Sci USA* **85**: 99-102
20. Fairall L, Rhodes D (1992) *Nucleic Acids Res* **20**: 4727-4731
21. Smith JR, Jackson J, Brown DD (1984) *Cell* **37**: 645-652
22. Fairall L, Martin S, Rhodes D (1989) *EMBO J* **8**: 1809-1817
23. Fairall L, Rhodes D, Klug A (1986) *J Mol Biol* **192**: 577-591
24. Liao X, Clemens KR, Tennant L, Wright PE, Gottesfeld JM (1992) *J Mol Biol* **223**: 857-871
25. Veldhoen N, You Q, Setzer DR, Romaniuk PJ (1994) *Biochemistry* **33**: 7568-7575
26. Clemens KR, Liao X, Wolf V, Wright PE, Gottesfeld JM (1992) *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 10822-10826
27. Hayes JJ, Clemens KR (1992) *Biochemistry* **31**: 11600-11605
28. Sakonju S, Brown DD, Engelke D, Ng S-Y, Shastri BS, Roeder RG (1981) *Cell* **23**: 665-675
29. Hayes JJ, Tullius TD (1992) *J Mol Biol* **227**: 407-417
30. Tliesen HJ, Buch C (1991) *FEBS Lett* **283**: 23-26
31. Pavletich NP, Pabo CO (1991) *Science* **252**: 809-817
32. Romaniuk PJ (1985) *Nucleic Acids Res* **13**: 5369-5387
33. Hanas JS, Hazuda DJ, Bogenhagen DF, Wu FY-H, Wu C-W (1983) *J Biol Chem* **258**: 14120-14125
34. Romaniuk PJ, de Stevenson IL, You Q (1989) *Molecular Biology of RNA* Ed by Liss AR, Inc., 123-132
35. Romaniuk PJ, de Stevenson IL, Wong HA (1987) *Nucleic Acids Res* **15**: 2737-2755
36. Romby P, Baudin F, Brunel C, de Stevenson IL, Romaniuk PJ, Ehresmann C, Ehresmann B (1990) *Biochimie* **72**: 437-452
37. Baudin F, Romaniuk PJ (1989) *Nucleic Acids Res* **17**: 2043-2056
38. Bogenhagen DF, Sands MS (1992) *Nucleic Acids Res* **20**: 2639-2645
39. Huber PW, Wool IG (1986) *Proc Natl Acad Sci* **83**: 1596-1597
40. Baudin F, Romby P, Romaniuk PJ, Ehresmann B, Ehresmann C (1989) *Nucleic Acids Res* **17**: 10035-10046
41. Andersen H (1987) *FEBS Letters* **217**: 193-202
42. Christiansen J, Brown RS, Sproat BS, Garret RA (1987) *EMBO J* **6**: 453-460
43. Romaniuk PJ (1989) *Biochemistry* **28**: 1388-1395
44. Theunissen O, Rudt F, Guddat U, Mentzel H, Pieler T (1992) *Cell* **71**: 679-690
45. Clemens KR, Wolf V, McBryant SJ, Zhang P, Liao X, Wright PE, Gottesfeld JM (1993) *Science* **260**: 530-533
46. Andersen J, Delihans N (1986) *J Biol Chem* **261**: 2912-2917
47. Gaskins CJ, Hanas JS (1990) *Nucleic Acids Res* **18**: 2117-2123
48. Gaskins CJ, Fiser-Littell RM, Duke AL, Hanas JS (1989) *Nucleic Acids Res* **17**: 781-794
49. Wang CK, Well PA (1989) *J Biol Chem* **264**: 1092-1099
50. Archambault J, Milne CA, Schappert KT, Baum B, Friesen JD, Segall J (1992) *J Biol Chem* **267**: 3282-3288
51. Moorefield B, Roeder RG (1994) *J Biol Chem* **269**: 20857-20864
52. Seifart KH, Wang L, Waldschmidt R, Jahn D, Wingender E (1989) *J Biol Chem* **264**: 1702-1709
53. Waldschmidt R, Jahn D, Teichmann M, Jahn M, Meissner W, Seifart KH (1990) *Eur J Biochem* **194**: 167-176
54. Hanas JS, Gaskins CJ, Smith JF, Ogilvie MK (1992) *Progress in Nucleic Acids Res and Mol Biol* **43**: 205-239
55. Willis IM (1993) *Eur J Biochem* **212**: 1-11
56. Krajewska WM (1992) *Int J Biochem* **24**: 1885-1898



## 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”.

# Szukanie igły w stogu siana. Identyfikacja genów ulegających różnicowej ekspresji

## Looking for a needle in a haystack. Identification of differentially expressed genes

MICHAŁ DĄBROWSKI\*

### Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Biblioteki cDNA
- III. Przeszukiwanie biblioteki
  - III-1. Przeszukiwanie +/-
  - III-2. Statystyka przeszukiwania +/-
- IV. Techniki oparte o hybrydyzację w roztworze
  - IV-1. Hybrydyzacja odejmująca
  - IV-2. Kinetyka hybrydyzacji w roztworze
  - IV-3. Rozdział fragmentów jednoniciowych od dwuniciowych
  - IV-4. Odjęte sondy i odjęte biblioteki cDNA
  - IV-5. Różnicowa hybrydyzacja kompetycyjna
- V. Różnicowa prezentacja RNA
  - V-1. Statystyka różnicowej prezentacji RNA
- VI. Dwukierunkowa elektroforeza białek
- VII. Przykłady sklonowanych genów
- VIII. Porównanie opisanych technik

**Wykaz stosowanych skrótów:** cDNA — DNA komplementarny do mRNA; PCR — łańcuchowa reakcja polimerazy; PDGF — płytkopochodny czynnik wzrostowy; cRNA — RNA komplementarny do mRNA.

### I. Wstęp

Przedmiotem tego przeglądu są techniki identyfikacji genów, które różnią się ekspresją na poziomie mRNA w różnych typach lub stanach czynnościowych komórek lub tkanek, w sytuacji gdy brak jest informacji o sekwencji tych genów i nie są dostępne specyficzne przeciwciała w stosunku do ich produktu białkowego ani metody czynnościowego oznaczenia tego produktu.

### II. Biblioteki cDNA

Komplementarny DNA (cDNA) powstaje na matrycy mRNA przy udziale odwrotnej transkryptazy. Na matrycy pierwszej nici cDNA dokonuje się syntezy drugiej nici za pomocą polimerazy DNA. Względna częstość (udział) określonych sekwencji cDNA w bib-

### Contents:

- I. Introduction
- II. cDNA libraries
- III. Library screening
  - III-1. +/- screening
  - III-2. Statistics of +/- screening
- IV. Techniques based on hybridization in solution
  - IV-1. Subtractive hybridization
  - IV-2. Kinetics of hybridization in solution
  - IV-3. Separation of single and double stranded fragments
  - IV-4. Subtracted probes and subtracted cDNA libraries
  - IV-5. Differential competition hybridization
- V. Differential RNA display
  - V-1. Statistics of differential RNA display
- VI. Two-dimensional protein electrophoresis
- VII. Examples of the cloned genes
- VIII. Comparison of the described techniques

liotece odzwierciedla ich udział w wyjściowej populacji mRNA.

Biblioteka cDNA jest to populacja cząsteczek cDNA wbudowanych w cząsteczki wektora zdolnego do replikacji (zwykle plazmidu lub bakteriofaga). Biblioteki cDNA tworzy się z dwóch zasadniczych powodów. Po pierwsze, RNA jest trudny do manipulacji ze względu na wszechobecność RNAaz. Po drugie, cząsteczkę wektora z zawartym w niej cDNA można namnażać, co znacznie ułatwia izolację klonów zawierających cDNA kodujące określone białka [2, 3]. Możliwa jest konstrukcja biblioteki z bardzo małej wyjściowej ilości RNA z wykorzystaniem amplifikacji cDNA [4].

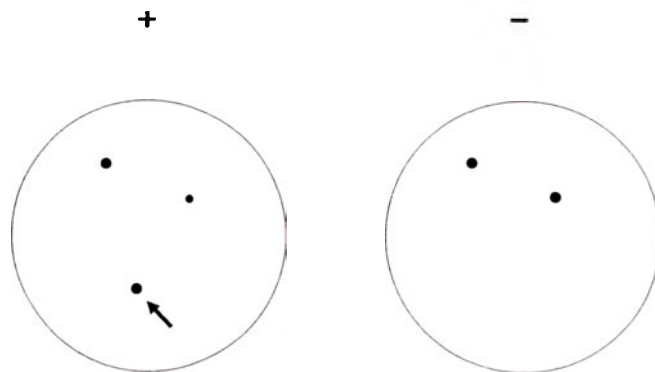
### III. Przeszukiwanie biblioteki

W celu znalezienia w plazmidowej lub fagowej bibliotece cDNA, klonu zawierającego określoną sekwencję, bakterie zawierające część biblioteki wysiewa się z taką gęstością, aby pojedyncze kolonie lub łyśinki nie zlewały się ze sobą. Następnie, część DNA zawartego w każdej kolonii lub łyśince zostaje przeniesiona na filtr z nitrocelulozy, w taki sposób że stanowi on odbicie szalki [5, 6]. Filtr poddaje się hybrydyzacji z sondą komplementarną do poszukiwanej sekwencji, płukaniu i autoradiografii [2].

\* Pracownia Hodowli Komórek i Tkanek, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego, ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa

### III-1. Przeszukiwanie +/-

Technika ta umożliwia identyfikację rodzajów mRNA, którymi różnią się dwie populacje komórek [7-9]. Komórki te mogą różnić się pochodzeniem tkankowym, etapem różnicowania albo stanem czynnościowym. Tradycyjnie jedną z próbek oznacza się plusem (+) a drugą minusem (-). Bakterie zawierające część biblioteki cDNA zostają wysiane na szalki, z każdej szalki wykonuje się po dwie repliki [5, 10]. Na matrycy mRNA + i -, produkuje się radioaktywne sondy cDNA. Z każdej pary jeden filtr zostaje poddany hybrydyzacji z sondą +, a drugi -. Pozycje na filtrze które dały silniejszy sygnał z sondą + niż z sondą - identyfikują klon zawierający sekwencje których udział w sondzie cDNA +, a zatem i wyjściowym mRNA, jest większy niż w sondzie cDNA - (Ryc. 1).



Ryc. 1. Przeszukiwanie +/-  
Biblioteka cDNA + (dla uproszczenia przedstawiono tylko 3 klon) została wysiana na szalkę a następnie wykonano z niej 2 jednakowe repliki. Jeden filtr poddano hybrydyzacji z sondą cDNA +, a drugi z sondą cDNA -. Klon oznaczony strzałką zawiera sekwencję specyficzną dla tkanki +.

### III-2. Statystyka przeszukiwania +/-

Znalezienie klonu cDNA w bibliotece wymaga uwzględnienia jego udziału w wyjściowej populacji mRNA i jej złożoności.

Częstość względna lub udział (ang. *abundance*) danego rodzaju mRNA, to iloraz liczby jego kopii przez całkowitą liczbę cząsteczek mRNA w komórce. Złożoność (ang. *complexity*) populacji cząsteczek mRNA lub cDNA to suma długości wszystkich mRNA lub cDNA z wyłączeniem powtórzeń tej samej sekwencji. Parametr ten zależy od liczby rodzajów mRNA obecnych w komórce i ich średniej długości.

Przeszukiwanie biblioteki spełnia warunki schematu Bernoulego i może być opisane przez rozkład dwumianowy  $P = n! : [k!(n-k)!] \cdot a^k (1-a)^{n-k}$ , gdzie P — prawdopodobieństwo k sukcesów w n prób (znalezienia k razy szukanej sekwencji wśród n klonów biblioteki)

a — prawdopodobieństwo sukcesu w pojedynczej próbie (udział danego mRNA)

Szansa znalezienia co najmniej jeden raz szukanej sekwencji wśród n klonów wynosi

$$P = 1 - (1 - a)^n$$

Liczba klonów które trzeba przeszukać aby z określonym prawdopodobieństwem znaleźć dany klon

$$n = \log P : \log(1-a)$$

Na przykład, aby z prawdopodobieństwem  $P = 0.99$  znaleźć klon którego udział  $a = 10^{-4}$  (0.01%) konieczne jest przeszukiwanie  $n = \log 0.99 : \log 10^{-4} = 5 \cdot 10^4$  klonów.

Widać, że dla znalezienia klonów o niskim udziale trzeba przeszukać bardzo dużą liczbę klonów. Ponadto, w przypadku przeszukiwania +/- zwykle używa się sondy cDNA o dużej złożoności. Część aktywności sondy przypadająca na daną sekwencję wynosi

$$S = C \cdot a$$

C — całkowita aktywność sondy

a — udział danego mRNA

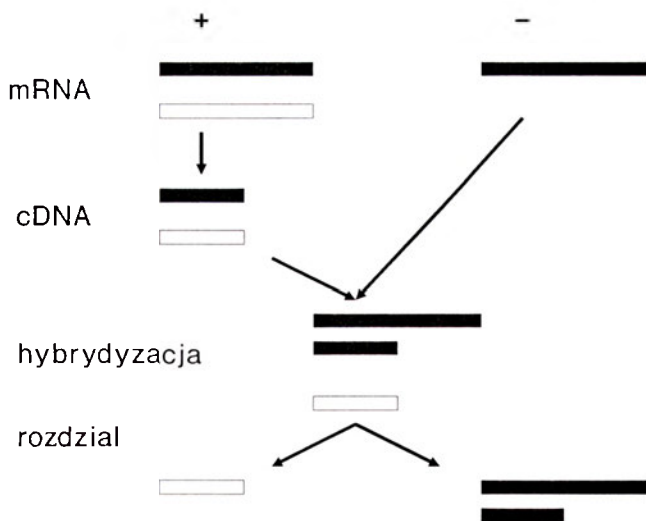
W praktyce, jeżeli całkowita aktywność sondy cDNA wynosi ok.  $10^7-10^8$  cpm, a aktywność sondy związana z pojedynczą kolonią na filtrze która daje wyraźny sygnał na autoradiogramie jest rzędu  $10^3$  cpm [6], udział mRNA które można zidentyfikować metodą przeszukiwania +/- wynosi około  $10^{-4}-10^{-5}$ . W celu znalezienia rodzajów mRNA, których udział jest mniejszy od tej wartości opracowano technikę hybrydyzacji odejmującej, która zmniejsza złożoność puli cDNA.

## IV. Techniki oparte o hybrydyzację w roztworze

### IV-1. Hybrydyzacja odejmująca

Technika ta (ang. *subtractive hybridization*) polega na prowadzeniu hybrydyzacji w roztworze sekwencji komplementarnych z dwóch tkanek, a następnie rozdzieleniu fragmentów pozostałych w formie jednoniciowej od dwuniciowych hybryd [11-14]. Hybrydyzację najczęściej prowadzi się pomiędzy cDNA z tkanki + a mRNA z tkanki - [13, 14], ale może ona być prowadzona także w innych układach np. cDNA +/cDNA - [15], mRNA +/cRNA -, pod warunkiem zachowania komplementarności nici kwasów nukleinowych obu populacji. Sekwencje występujące w mRNA z obu tkanek znajdują się we frakcji dwuniciowej, dlatego frakcja jednoniciowa zostanie wzbogacona w sekwencje tkankowo specyficzne (Ryc. 2).

Warunki hybrydyzacji zapewniające największą szybkość reakcji, to wysokie stężenia kationów jednowartościowych (rzędu 0.3 M) i kwasów nukleinowych (rzędu 1 mg/ml). W klasycznej hybrydyzacji odejmującej, w celu przyspieszenia reakcji, używa się 10-100-krotnego nadmiaru próbki minus (ang. *driver*). W takich warunkach można zidentyfikować tylko sekwencje których udział w mRNA + jest ponad 10-100 razy wyższy niż w populacji -. W praktyce metoda ta jest bardzo przydatna w celu wykrywania transkryptów obecnych tylko w populacji mRNA + ale nie w populacji - [18].



Ryc. 2. Hybrydyzacja odejmująca.

Dla uproszczenia pojedyncze prostokąty reprezentują wiele sekwencji RNA lub cDNA. W trakcie hybrydyzacji, sekwencje występujące w zarówno tkance + jak i - (czarne), tworzą dwuniciowe hybrydy, a sekwencje specyficzne dla tkanki - (białe) pozostają w formie jednoniciowej. Rozdziału dokonuje się na kolumnach HAP lub z użyciem biotyny — streptawidyny.

Prowadzenie reakcji w warunkach gdy wyjściowe stężenia sekwencji + i - są równe (i wysokie), choć technicznie trudniejsze, pozwala na identyfikację rodzajów mRNA, których udział w mRNA + różni się zaledwie kilka razy od udziału w mRNA - [19].

Czas hybrydyzacji można skrócić stosując reasocjację w emulsji fenolowej (ang. *phenol emulsion reassociation technique* — PERT) [3, 20, 21]. Powstanie emulsji zwiększa szybkość tworzenia hybryd ok. 1000 razy, prawdopodobnie przez lokalne zwiększenie stężenia substratów na granicy faz. PERT działa tylko dla hybrydyzacji DNA/DNA.

Część komplementarnych sekwencji nie tworzy hybryd, prawdopodobnie ze względu na wysoki udział AT i związaną z tym niższą temperaturą topnienia hybryd. W celu ich usunięcia, po kilku rundach hybrydyzacji odejmującej stosuje się niekiedy hybrydyzację +/+ i po rozdziale zachowuje się frakcję dwuniciową [3, 19].

Dla zwiększenia całkowitej ilości materiału po hybrydyzacji odejmującej, lub pomiędzy jej kolejnymi rundami, stosuje się niekiedy łańcuchową reakcję polimerazy (PCR) [23, 24]. PCR pozwala namnożyć *in vitro* odcinek DNA, jeżeli dysponujemy primerami komplementarnymi do obu jego końców, przez wielokrotne przeprowadzenie cyklu przyłączenia primerów, replikacji DNA i denaturacji. W tym celu do dwuniciowego cDNA po odjęciu dołącza się sekwencje rozpoznawane przez primery użyte następnie do amplifikacji.

#### IV-2. Kinetyka hybrydyzacji w roztworze

Reasocjacja komplementarnych nici kwasów nukleinowych jest procesem o kinetyce 2 rzędu. Dla przypadku gdy wyjściowe stężenia obu nici są jed-

nakowe, forma jednoniciowa zanika według równania  $S = (1 + kC_0t)^{-0.44}$  gdzie  
 $S$  — stężenie formy jednoniciowej  
 $k$  — stała szybkości reakcji  
 $C_0$  — początkowe stężenie substratów [mol/l]  
 $t$  — czas reakcji [s]

Teoretycznie reakcja osiąga stan bliski równowagi gdy  $C_0t > 100$ . W praktyce stosuje się  $C_0t > 10^3$ . Wymagany w tym celu czas wynosi niekiedy kilkadziesiąt godzin.

Jeżeli jednak jedna z komplementarnych sekwencji występuje w dużym nadmiarze reakcja zachodzi według kinetyki 1 rzędu  $S = e^{-kC_0t}$ .

Stan równowagi osiągnięty zostaje gdy  $C_0t > 30$ , czyli około 3-krotnie szybciej.

#### IV-3. Rozdział sekwencji jednoniciowych od dwuniciowych

Stosuje się w tym celu chromatografię powinowactwa na kolumnach wypełnionych hydroksypatytym (HAP) [2, 3, 13]. W temperaturze 60°C, w buforze fosforanowym o niskim stężeniu zarówno jedno jak i dwuniciowe kwasy nukleinowe ulegają związaniu z HAP. Następnie, buforami o rosnącym stężeniu fosforanów, kolejno eluuje się, najpierw formy jednoniciowe, a potem dwuniciowe.

Inny sposób rozdziału wymaga aby zastosowany *driver* był połączony z cząsteczkami biotyny [21]. Po hybrydyzacji do mieszaniny dodaje się streptawidynę — białko silnie łączące się z biotyną. Połączone ze streptawidyną dwuniciowe hybrydy i wolny *driver* zostają usunięte przez ekstrakcję fenolem i chloroformem.

#### IV-4. Odjęte sondy i odjęte biblioteki cDNA

cDNA po hybrydyzacji odejmującej może zostać wyznakowane do wysokiej specyficznej aktywności przez syntezę drugiej nici DNA [2, 3, 22] i użyte do przeszukiwania biblioteki cDNA. W tak otrzymanej odjętej sondzie większa część całkowitej radioaktywności przypada na sekwencje specyficzne dla tkanki +, co pozwala na identyfikację mRNA, których udział jest mniejszy niż 0.01% (patrz 3.2). Wklonowanie w cząsteczki wektora populacji cząsteczek cDNA będącej produktem hybrydyzacji odejmującej, czyli wytworzenie odjętej biblioteki cDNA, pozwala na wielokrotne zredukowanie liczby klonów, które trzeba przeszukać w celu znalezienia określonej, zwłaszcza rzadkiej sekwencji, obecnej w populacji mRNA + [22]. Dzieje się tak dlatego, że jej reprezentacja (udział) w bibliotece wzrasta.

#### IV-5. Różnicowa hybrydyzacja kompetycyjna

Technika ta polega na dodaniu, do sondy + używanej do przeszukiwania biblioteki cDNA +, dużego molarnego nadmiaru niewyznakowanej sekwencji -.

Sekwencje sondy wspólne dla obu tkanek ulegają połączeniu w roztworze, a ściślej ustala się stan równowagi pomiędzy tymi sekwencjami w roztworze a związanymi z filtrem, zaś sekwencje specyficzne dla tkanki + pozostają w postaci jednoniciowej i mogą połączyć się z komplementarnymi cDNA na filtrze [27]. W ten sposób zmniejszeniu ulega złożoność sondy związanej z filtrem.

## V. Różnicowa prezentacja RNA

Duża czasochłonność metod opartych na bibliotekach cDNA doprowadziła do opracowania nowej techniki nazywanej różnicową prezentacją RNA (ang. *differential RNA display*) [28-31].

Metoda różnicowej prezentacji RNA ma dwa etapy. W pierwszym dokonuje się syntezy pierwszej nici cDNA z użyciem primera oligo-dT zmodyfikowanego na końcu 3' przez dodanie 2 arbitralnie wybranych nukleotydów. Strukturę primera opisuje wzór  $5'T_{12}MN$ , gdzie M, N oznaczają jeden z 4 nukleotydów. Koniec 3' takiego primera jest komplementarny tylko do 1/12 wszystkich rodzajów poli-A RNA obecnych w komórce, zakładając że w populacji mRNA komórki na dwóch ostatnich pozycjach przed końcem poli-A wszystkie 4 nukleotydy występują z jednakową częstością. Powstałe cDNA poddane jest następnie amplifikacji z użyciem tego samego primera 3' i, jako drugiego primera, dekameru o arbitralnie dobranej sekwencji. Długość primerów i warunki reakcji dobrane są tak aby każdy prążek reprezentował z dużym prawdopodobieństwem fragment sekwencji jednego genu (patrz V-1). Wzór długości fragmentów po amplifikacji jest różny dla niejednakowych wyjściowych populacji mRNA i różnych zestawów primerów. Prążki charakterystyczne dla każdej tkanki najłatwiej znaleźć gdy produkty amplifikacji poddane są elektroforezie w sąsiednich ścieżkach żelu sekwencjonującego. Tkankowo specyficzne prążki można wyciąć, zreampifikować, wklonować w plazmid, bądź użyć do syntezy sondy w celu przeszukania biblioteki, weryfikacji specyficzności ekspresji.

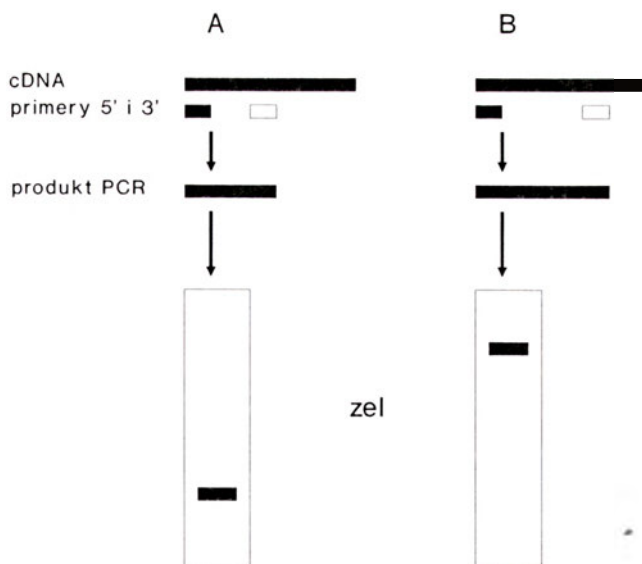
### V-1. Statystyka różnicowej prezentacji RNA

Technika ta opiera się na założeniu, że każda przypadkowo wybrana odpowiednio krótka sekwencja jest zawarta w którymś z rodzajów mRNA. Prawdopodobieństwo że L nukleotydowa sekwencja komplementarna do primera wystąpi w określonej pozycji cDNA wynosi

$$p = 4^L$$

Prawdopodobieństwo że taka sekwencja wystąpi co najmniej raz na odcinku cDNA o długości M nukleotydów, określone jest przez rozkład dwumianowy i wynosi

$$p^* = 1 - (1 - p)^M$$



Ryc. 3. Różnicowa prezentacja RNA.

Dla uproszczenia przedstawiono jedynie sekwencje cDNA które są: 1. specyficzne dla tkanki A lub B i 2. rozpoznawane przez użytą parę primerów. Te tkankowo specyficzne, a więc różne, sekwencje generują produkty PCR o różnej długości. W rzeczywistości, stosowana para primerów rozpoznaje kilkadziesiąt rodzajów cDNA, z których większość powtarza się w porównywanym tkankach. Dlatego, na żelu obserwuje się kilkadziesiąt prążków, spośród których jedynie pojedyncze są tkankowo specyficzne.

Spodziewana liczba odcinków DNA uzyskanych w wyniku PCR z jednym primerem 3' i primerem 5' o budowie  $T_{11}MN$  wynosi  $E(X) = n \cdot p$  gdzie

$n$  — złożoność pierwszej nici cDNA

Przy założeniu, że komórka zawiera  $10^4$  rodzajów mRNA, a średnia długość pierwszej nici wynosi 1000 nukleotydów  $n = 10^4 : 12 \cdot 1000 = 8.3 \cdot 10^5$ . Stąd

$$E(X) = 8.3 \cdot 10^5 \cdot 4^{-10} = 0.8$$

W oryginalnie opisanych warunkach obserwuje się około 100 prążków, co sugeruje, że 10 nukleotydowe primery zachowują się jak 6-mer. Użycie 6-merów w oryginalnie opisanych warunkach reakcji nie pozwalało na skuteczną amplifikację.

Liczba primerów o niezależnych sekwencjach których trzeba użyć aby z prawdopodobieństwem  $P$  co najmniej jeden primer był komplementarny do dowolnej sekwencji DNA o długości  $M$  wynosi

$$\begin{aligned} n &= \log P : \log(1 - p^*) = \log P : \log(1 - p)^M = \\ &= \log P : M \cdot \log(1 - p) \end{aligned}$$

Dla primera 10 nukleotydowego, cDNA o długości 500 nukleotydów i oczekiwanego poziomu ufności  $P = 0.99$

$$n = \log 0.99 : 500 \cdot \log(1 - 4^{-10}) = 21.1$$

## VI. Dwukierunkowa elektroforeza białek

Metoda dwukierunkowej elektroforezy w żelu poliakrylamidowym (2D-PAGE) pozwala na rozdzielanie około 1000 białek komórkowych, różniących się masą cząsteczkową lub ładunkiem [32]. Z tego względu

stanowi ona podstawowe narzędzie badania różnicowej ekspresji genów na poziomie białka [33]. Próbki białka poddane rozdziałowi mogą być produktami translacji *in vitro*, wówczas, technika ta może służyć do analizy ekspresji również na poziomie mRNA [34].

## VII. Przykłady sklonowanych genów

Przy użyciu przeglądania +/- zidentyfikowano m.in. 14 rodzajów mRNA indukowanych przez PDGF w linii komórkowej 3T3. Udział scharakteryzowanych sekwencji w populacji mRNA wynosił  $2 \cdot 10^{-3}$ - $9 \cdot 10^{-3}$ , stopień indukcji wynosił 10-20 razy [9].

Niedawno, sklonowano 5 rodzajów mRNA których poziom ekspresji w hipokampie zwiększył się po drgawkach wywołanych ogólnym podaniem metrazolu, w obecności cykloheksymidu. Ekspresja tych mRNA wzrosła 6-8 razy [8].

Przy użyciu odjętej sondy cDNA sklonowano m.in. mRNA kodujące receptor limfocytów T [14, 18]. Według autorów metoda pozwala wykryć klon o udziale  $10^{-5}$ . Podobną metodą zidentyfikowano 5 rodzajów mRNA aktywowanych w trakcie tworzenia konidiów u *Aspergillus nidulans*. Udział tych sekwencji w populacji mRNA wynosił  $10^{-5}$ , stopień indukcji 10-100 razy [16].

Wykorzystując odjęte biblioteki cDNA zidentyfikowano ostatnio 52 rodzaje mRNA indukowane przez kwas kainowy w zakręcie zębatym hipokampa. Sekwencje 17 z nich odpowiadały znanym genom, reszta była nowa [22].

Zastosowanie hybrydyzacji odejmującej o niskim stosunku cDNA+ do mRNA pozwoliło wyizolować 50 rodzajów mRNA indukowanych uszkodzeniem DNA przez UV. Stopień indukcji wynosił od 1.8 do 28 razy (dla większości klonów był on bliższy tej niższej wartości) [19].

Połączenie hybrydyzacji odejmującej i PCR umożliwiło identyfikację 16 mRNA ulegających indukcji od 6 do ponad 20 razy w trakcie resorpcji ogona kijanki. Udział zidentyfikowanych mRNA wynosił  $10^{-3}$ - $10^{-5}$  [25].

Różnicowa hybrydyzacja kompetycyjna pozwoliła wyizolować z klonu cytotoksycznych limfocytów T sekwencję mRNA kodującego specyficzną proteazę serynową [27].

Używając różnicowej prezentacji RNA zidentyfikowano rodzaje mRNA różniące tumorogenną linię fibroblastów od linii nietumorogennej [28] i mRNA różniące normalne ludzkie komórki nabłonkowe sutka od komórek raka sutka [30]. W kolejnej pracy ta sama grupa zidentyfikowała alfa 6 integrynę jako potencjalny antyonkogen [29]. Ostatnio, inna grupa zastosowała tę technikę do porównania rodzajów mRNA obecnych w komórkach wątroby na różnych etapach regeneracji po hepatektomii [35].

Połączenie translacji *in vitro* i dwukierunkowej elektroforezy umożliwiło wykrycie jakimi rodzajami

białek i mRNA w tkance mózgowej różnią się osoby chore na schizofrenię lub depresję od osobników kontrolnych [34].

## VIII. Porównanie opisanych technik

Zaletą przeszukiwania +/- jest możliwość identyfikacji mRNA których poziom uległ niewielkiej nawet zmianie, zarówno w górę jak i w dół. Brak etapów potencjalnie uszkadzających DNA pozwala na uzyskiwanie cDNA pełnej długości. Ograniczeniem tej metody jest stosowalność dla mRNA o udziale nie mniejszym niż  $10^{-5}$ .

Zaletą metod opartych na hybrydyzacji odejmującej jest duża czułość pozwalająca na wykrycie bardzo rzadkich mRNA. W niektórych zastosowaniach ograniczeniem jest niemożność jednoczesnego porównania więcej niż 2 populacji RNA [33]. Hybrydyzacja odejmująca prowadzona w warunkach dużego nadmiaru drivera nie pozwala na wykrycie mRNA których stopień indukcji jest mniejszy od stosunku drivera mRNA — do cDNA+. Wady tej pozbawiona jest trudniejsza technicznie hybrydyzacja prowadzona w warunkach równych stężeń cDNA+ i mRNA [19].

Różnicowa prezentacja RNA jest techniką stosunkowo nową. Jej główną zaletą jest możliwość równoległego porównywania ekspresji mRNA w wielu populacjach komórek.

### Podziękowanie

Praca dofinansowana z grantu KBN 2228/4/91.

Artykuł otrzymano 13 listopada 1994 r.  
Zaakceptowano do druku 14 marca 1995 r.

### Piśmiennictwo

1. Calvet JP (1991) *Pediatr Nephrol* 5: 751-757
2. Maniatis T, Fritsch E, Sambrook J (1989) W: *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nowy Jork
3. Krieger M (1990) W: *Gene transfer and expression: a laboratory manual*. W. H. Freeman and Company, Nowy Jork
4. Belyavsky A, Vinogradova T, Rajewsky K (1989) *Nucleic Acids Res* 17: 2919-2932
5. Hanahan D, Meselson M (1983) W: Wu R, Grossman L, Moldave K (red) *Meth Enzymol* t 100. Academic Press, Nowy Jork. 333-342
6. Grunstein M, Hogness DS (1975) *Proc Natl Acad Sci USA* 72: 3961-65
7. St John TP, Davies RW (1979) *Cell* 16: 443-452
8. Qian Z, Gilbert ME, Colicos MA, Kandel ER, Kuhl D (1993) *Nature (Lond)* 361: 453-457
9. Cochran BH, Reffel AC, Stiles CD (1983) *Cell* 33: 939-947
10. Lemke SJ, Burke T, Boder GB, Moore RE (1993) *Biotechniques* 14: 415-419
11. Sargent TD, David IB (1993) *Science* 222: 135-139
12. Sargent TD (1987) W: Berger SL, Kimmel AR (red) *Meth Enzymol* t 152. Academic Press, Nowy Jork, 423-432
13. Haedrick SM, Cohen DI, Nielsen EA, Davis MM (1984) *Nature (Lond)* 308: 149-153
14. Davis M (1986) W: Weir D (red) *Handbook of Experimental Immunology*. Blackwell Scientific, Oxford



15. Duguid JR, Dinauer MC (1986) *Nucl Acids Res* **18**: 2789-2792
16. Zimmermann CR, Orr WC, Leclerc RF, Barnard EC, Timberlake WE (1980) *Cell* **21**: 709-715
17. Rhyner TA, Biguet NF, Berrard S, Borbely AA, Mallet J (1986) *J Neurosci Res* **16**: 167-181
18. Hedrick SM, Cohen DI, Nielsen EA, Davis MM (1984) *Nature* (Lond) **308**: 149-153
19. Fargnoli J, Holbrook NJ (1990) *Anal Biochem* **187**: 364-377
20. Kohne D, Levison S, Byers M (1977) *Biochemistry* **16**: 5329-5341
21. Travis G, Sutcliffe J (1988) *Proc Natl Acad Sci USA* **85**: 1696-1700
22. Nedivi E, Hevroni D, Naot D, Israeli D, Citri Y (1993) *Nature* (Lond) **363**: 718-722
23. Timblin C, Battey J, Knehl WM (1990) *Nucl Acids Res* **18**: 1587-1593
24. Sive HL, St John T (1988) *Nucl Acids Res* **16**: 10937
25. Wang Z, Grown DD (1991) *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 11505-11509
26. Mangiarotti G, Chung S, Zucker C, Lodish HF (1981) *Nucl Acids Res* **9**: 947-963
27. Gershenfeld HK, Weissman IL (1986) *Science* **232**: 854-8588
28. Liang P, Pardee AB (1992) *Science* **257**: 967-971
29. Sager R, Anisowicz A, Neven M, Liang P, Satiropoulou G (1993) *FASEB J* **7**: 964-970
30. Liang P, Averboukh L, Pardee AB (1993) *Nucl Acids Res* **21**: 3269-3275
31. Sun Y, Hegamyer G, Colburn NH (1994) *Cancer Res* **54**: 1139-1144
32. Anderson NG, Anderson NL (1978) *Anal Biochem* **85**: 331-340
33. Lefkovits I, Kettman JR, Coleclough C (1990) *Immunol Today* **11**: 157-162
34. Perret CW, Whatley SA, Ferrier IN, Marchbanks RM (1992) *Mol Brain Res* **12**: 163-171
35. Bauer D, Muller H, Reich J, Reidel H, Ahrenkiel V, Warthoe P, Strauss M (1993) *Nucl Acids Res* **21**: 4272-4280
36. Rothstein JL, Johnson D, De Loia JA, Skowronski J, Solter D, Knowles B (1992) *Genes Develop* **6**: 1190-1201

## Regulacja syntezy cząsteczki fibrynogenu

### Regulation of fibrinogen molecule synthesis

ELŻBIETA PLUSKOTA<sup>1</sup>,  
CZESŁAW S. CIERNIEWSKI<sup>2</sup>

#### Spis treści:

- I. Wprowadzenie
- II. Charakterystyka genu podjednostki  $\alpha$
- III. Charakterystyka genu podjednostki  $\beta$
- IV. Charakterystyka genu podjednostki  $\gamma$
- V. Powstawanie dojrzałych cząsteczek fibrynogenu
  - V-1. Regulacja ekspresji genów fibrynogenu
  - V-2. Translacyjne i potranslacyjne procesy składające się na syntezę fibrynogenu
  - V-3. Składanie i sekrecja cząsteczki fibrynogenu

#### Contents:

- I. Introduction
- II. Characteristics of gene of  $\alpha$  subunit
- III. Characteristics of gene of  $\beta$  subunit
- IV. Characteristics of gene of  $\gamma$  subunit
- V. Formation of matured fibrinogen molecules
  - V-1. Regulation of fibrinogen genes expression
  - V-2. Translational and posttranslational processes in fibrinogen synthesis
  - V-3. Assembly and secretion of fibrinogen molecules

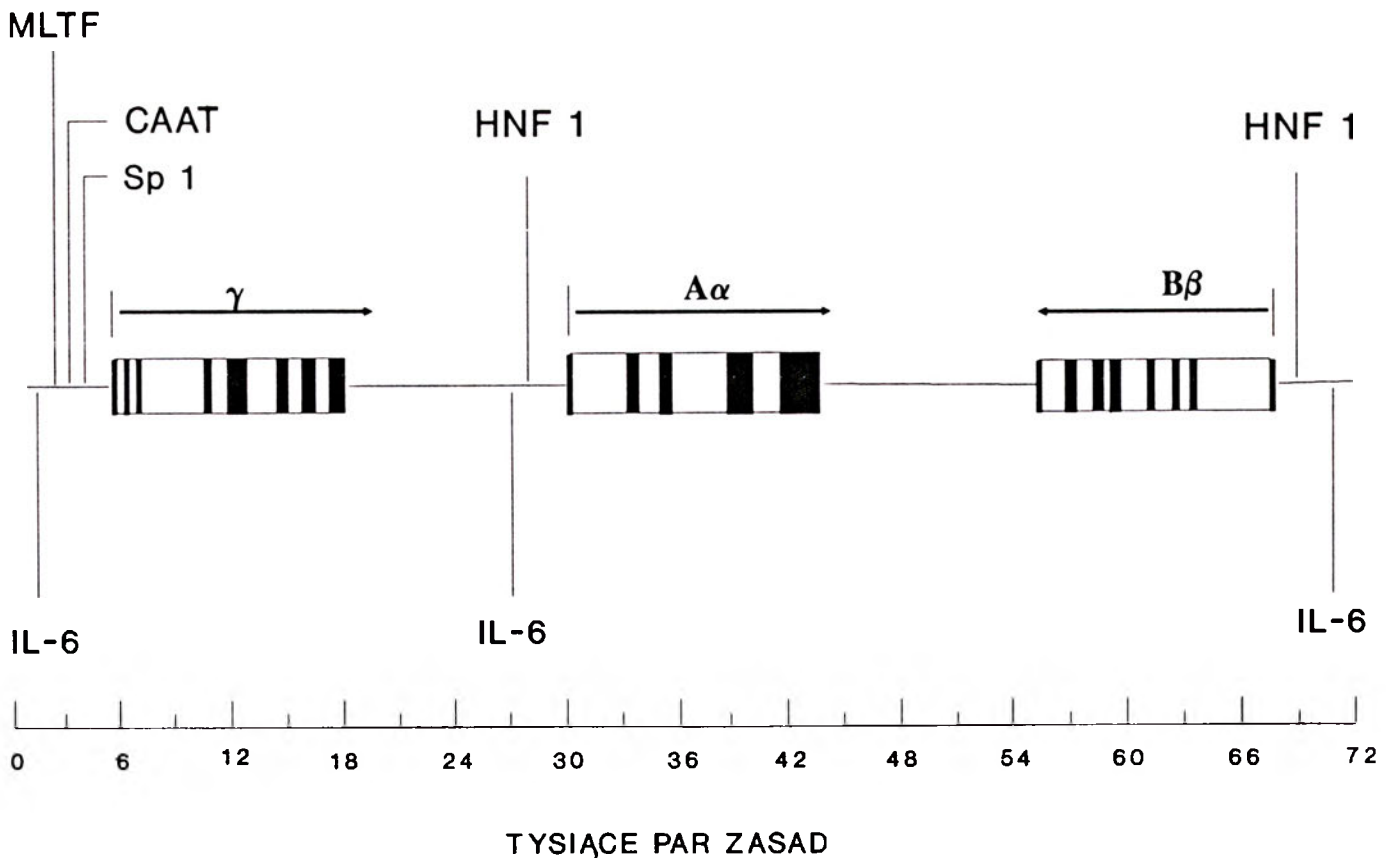
#### I. Wprowadzenie

Fibrynogen jest od wielu lat obiektem żywego zainteresowania między innymi dlatego, że: (a) odgrywa zasadniczą rolę w procesie hemostazy, (b) stanowi wygodny model do badania cząsteczek białkowych o bardzo złożonej strukturze III- i IV-rzędowej, (c) pozwala śledzić zależność między budową białka i jego fizjologiczną funkcją, a także dlatego, że (d) jest dobrym modelem do badania mechanizmu syntezy białek zbudowanych z wielu łańcuchów polipeptydowych.

<sup>1</sup> Mgr, <sup>2</sup> prof. dr hab., Zakład Biofizyki, Instytut Fizjologii i Biochemii, Akademia Medyczna w Łodzi, ul. Lindleya 3, 90-131 Łódź

Białko to jest substratem trombiny, końcowego produktu kaskadowej aktywacji układu krzepnięcia krwi. Po rozszczepieniu czterech wiązań peptydowych, z fibrynogenu powstają monomery włókniaka, które spontanicznie polimeryzują tworząc szkielet czopu hemostatycznego lub zakrzepu. Fibrynogen ma również zdolność swoistego oddziaływania z receptorami integrynowymi płytek krwi i innych komórek obecnych w naczyniach. W ten sposób białko to bierze udział zarówno w bardzo wczesnych, jak i w końcowych etapach tworzenia czopu hemostatycznego, umożliwiając agregację płytek i powstanie siateczki włókniaka krwi.

Cząsteczka fibrynogenu jest dimerem, a każda podjednostka składowa zbudowana jest z trzech łań-



**Ryc. 1.** Organizacja genów trzech podjednostek fibrynogeny w ludzkim chromosomie 4. Strzałki wskazują kierunek przebiegu procesu transkrypcji. Lokalizację eksonów w genach oznaczono czarnymi prostokątami a sekwencji intronowych białymi. Ponadto zaznaczone są także pozycje miejsc wiążących czynniki transkrypcji: MLTF (*major late transcription factor*), SP1, CAAT-binding factor, HNF1 (*hepatic nuclear factor 1*), Il-6-interleukina 6.

cuchów polipeptydowych oznaczanych jako  $A\alpha$ ,  $B\beta$  i  $\gamma$ . Łańcuchy polipeptydowe są powiązane ze sobą wewnątrz- i międzylańcuchowymi mostkami disiarczkowymi. Budowę cząsteczki fibrynogeny można więc przedstawić ogólnym wzorem  $(A\alpha\beta\gamma)_2$ . Po odcięciu fibrynopeptydów A i B, powstałe monomery włókniaka mają wzór  $(\alpha\beta\gamma)_2$ . Powstawanie dojrzałych cząsteczek fibrynogeny jest procesem wieloetapowym i można w nim wyróżnić: (a) syntezę pojedynczych łańcuchów polipeptydowych, zachodzącą głównie w hepatocytach ale także w megakariocytach, (b) zwijanie i składanie dimerycznych cząsteczek, oraz (c) potranslacyjne modyfikacje cząsteczki, takie jak glikozylacja, fosforylacja czy też przyłączanie reszt siarczanowych. Synteza fibrynogeny, tak jak wszystkich białek złożonych z kilku łańcuchów polipeptydowych, jest więc procesem niezwykle złożonym i do końca nie w pełni zrozumiałym. Wpływ na poziom fibrynogeny we krwi, który normalnie wynosi od 2.0 do 3.8 g/l, mają czynniki środowiskowe (palenie tytoniu, dieta tłuszczowa) i czynniki genetyczne. Te ostatnie głównie odpowiedzialne są za duże odchylenia w zawartości fibrynogeny u różnych osobników. Wzrost syntezy fibrynogeny oraz jego stężenia we krwi, podobnie jak podwyższona aktywność czynnika VII i inhibitora aktywatora plazminogeny typu 1 (PAI-1), powoduje zwiększenie ryzyka pojawienia się niedokrwiennej choroby serca. Ze względu na to podwyższone stężenie fibrynogeny, tak jak nadciśnienie tętnicze, palenie

tytoniu, wysoki hematokryt, hiperlipidemia oraz otyłość, uważane jest za czynnik ryzyka pojawienia choroby sercowo-naczyniowej [1].

Podjednostki fibrynogeny kodowane są przez trzy odrębne geny, które występują jako pojedyncze kopie w ludzkim genomie, zlokalizowane w odcinku o długości 50 kbp ramienia długiego chromosomu 4 (prążki q23-q24). Geny te ułożone są liniowo w bliskim wzajemnym sąsiedztwie tworząc zespół, w którym centralny gen  $\alpha$  oflankowany jest przez gen  $\beta$  z jednej strony i gen  $\gamma$  z drugiej (Ryc. 1). Geny  $\alpha$  i  $\gamma$  transkrybowane są w zgodnym kierunku ku genowi  $\beta$  a gen  $\beta$  ulega transkrypcji z przeciwnej nici DNA w kierunku genów  $\alpha$  i  $\gamma$  [2].

Homologia sekwencji nukleotydowych oraz budowy domen typu ekson-intron na końcach 5', jak również bliskie sąsiedztwo genów fibrynogenowych sugerują ich wzajemne pokrewieństwo. Geny  $\alpha$ ,  $\beta$  i  $\gamma$  wyodrębniły się ze wspólnego prageny drogą podwójnej duplikacji i dywergencji około 500 mln lat temu [2].

## II. Charakterystyka genu podjednostki $\alpha$

Gen podjednostki  $\alpha$  zbudowany jest z około 10 kbp zgrupowanych w pięciu eksonach rozdzielonych przez cztery introny (Ryc. 1). Geny strukturalne stanowią około 23% całkowitej sekwencji nukleotydowej genu  $\alpha$ . cDNA dla podjednostki  $\alpha$  zbudowane jest z 2224 pz,

które obejmują 54-68 pz nie ulegających translacji, region kodujący peptyd sygnałowy, 1875 pz zapisu dla 625 reszt aminokwasowych polipeptydu  $\alpha$ , kodon stop — TAG, niekodujący region o długości 217 pz na końcu 3' oraz 20 pz sekwencji poli(A). Sygnał poliadenylacji AATAAA występuje w obrębie regionu niekodującego końca 3' w odległości 21 pz od sekwencji poli(A) [3]. W cDNA dla podjednostki  $\alpha$  zidentyfikowano osiem tandemowych powtórzeń sekwencji o długości 36-39 pz, które zlokalizowane są pomiędzy nukleotydami 905 i 1213. Poszczególne sekwencje powtórzone wykazują od 72 do 95% identyczności co sugeruje, że powstały one w wyniku duplikacji niewielkiego bo zbudowanego z 39 pz elementu genu [4]. cDNA dla podjednostki  $\alpha$  zawiera również dwa startowe kodony translacji dla metioniny w pozycji -19 oraz -16. Nie wiadomo, który z nich pełni swoją funkcję podczas syntezy łańcucha  $A\alpha$ . Długość peptydu sygnałowego łańcucha  $A\alpha$  szacowana jest więc na 16 lub 19 reszt aminokwasowych zależnie od tego, który z kodonów jest właściwym miejscem inicjacji [4].

### III. Charakterystyka genu podjednostki $\beta$

Gen podjednostki  $\beta$  o długości 13 kpz zbudowany jest z ośmiu eksonów rozdzielonych siedmioma intronami (Ryc. 1). Długość intronów jest zróżnicowana i waha się od 100 pz do 1500 pz. Największy z nich o długości 1.5 kpz zlokalizowany jest w końcu 5' genu pomiędzy pierwszym i drugim eksonem. Geny strukturalne stanowią 20% sekwencji nukleotydowej genu  $\beta$ . Rozmiary eksonów wynoszą od 100 do 400 pz [5]. Rozmieszczenie intronów w genie podjednostki  $\beta$  potwierdza hipotezę Gilberta [6], według której introny dzielą gen na strukturalne regiony odpowiadające funkcjonalnym domenom kodowanego białka. Pierwszy ekson genu podjednostki  $\beta$  koduje peptyd sygnałowy i fragment fibrynopeptydu B. Drugi ekson odpowiada fragmentowi zawierającemu wiązanie peptydowe wrażliwe na działanie trombiny oraz jedno z miejsc polimeryzacyjnych, natomiast eksony trzeci i czwarty, kodują regiony łańcucha z licznymi wiązaniami peptydowymi rozszczepianymi przez plazminę a także węzeł disiarczkowy domeny E utrzymujący właściwą strukturę cząsteczki fibrynogenu [6]. Promotor genu podjednostki  $\beta$  obejmuje ok. 200-300 pz w kierunku końca 5' od miejsca inicjacji transkrypcji. Odcinek ten zawiera kilka typowych dla promotora sekwencji TATA *box* wykazujących wysokie powinowactwo do czynników transkrypcyjnych [5]. W końcu 5' stwierdzono obecność trzech kodonów dla reszt metioninowych, które występują w pozycjach -16, -17 i -30. Nie wiadomo jednak, który z nich jest kodonem startowym, dlatego długość peptydu sygnałowego jest szacowana na 16-30 aminokwasów. Peptyd sygnałowy podjednostki  $B\beta$  zawiera zespół sześciu hydrofobowych reszt Leu, którym obustronnie towarzyszą hydrofilowe reszty Lys wraz z pozbawioną ładunku resztą

Ser, w miejscu działania proteazy sygnałowej [6].

cDNA dla podjednostki  $\beta$  tworzy 1932 pz, na które składa się 66 pz stanowiących zapis peptydu sygnałowego lub jego fragmentu, następnie 1383 pz kodujących 461 reszt aminokwasowych polipeptydu  $B\beta$ , kodon stopu — TAG, 431 pz regionu nie ulegającego translacji na końcu 3', a także fragmenty poli(A) o długości 19 pz. Nie ulegający translacji region końca 3' zawiera wiele nukleotydów A i T, które stanowią 69% całkowitej jego sekwencji, a także sygnał poliadenylacji AATAAA oddalony o 14 pz w kierunku końca 5' od regionu poliadenylowanego [6].

Wykryto trzy typy mRNA dla podjednostki  $\beta$ , różniące się długością regionów nie ulegających translacji, które występują na końcu 3'. Regiony te utworzone są przez 431, 167 albo 98 nukleotydów. Występowanie trzech rodzajów mRNA prawdopodobnie spowodowane jest odmiennym, wewnątrzrodowym dojrzewaniem pre-mRNA lub zmianami w procesie terminacji transkrypcji [6].

### IV. Charakterystyka genu podjednostki $\gamma$

Gen podjednostki  $\gamma$  zawiera ok. 10 kpz, które zgrupowane są w dziesięciu eksonach, rozdzielonych przez dziewięć sekwencji intronowych (Ryc. 1). Introny stanowią ok. 83% całkowitej sekwencji nukleotydowej genu  $\gamma$  [7]. cDNA dla podjednostki  $\gamma$  zbudowane jest z 1638 pz i obejmuje fragment o długości 71 pz stanowiący niekodującą część genu oraz 78 pz kodujących peptyd sygnałowy. Kolejne 1233 pz stanowi zapis kolejności 411 aminokwasów dojrzałego polipeptydu  $\gamma$ , następnie występuje kodon terminacji TAA, 207 pz nie ulegających translacji i 15 pz poli(A) końca 3'. Niekodujący region końca 3' cDNA dla podjednostki  $\gamma$  zawiera 68% nukleotydów A i T, a także sygnał poliadenylacji AATAAA zlokalizowany w odległości 19 pz od sekwencji poli(A) [8]. Kodon dla metioniny w pozycji -26 jest właściwym kodonem startowym translacji tej podjednostki. Fragment N-końcowy zawierający 26 reszt aminokwasowych wykazuje typową dla wszystkich sekwencji sygnałowych budowę i posiada liczne aminokwasy hydrofobowe oraz Ala, w miejscu odłączenia peptydu od pre-białka przez proteinazę sygnałową [8].

Podjednostka  $\gamma$  występuje w dwóch funkcjonalnie identycznych, lecz strukturalnie odmiennych formach, tj. jako  $\gamma$  oraz  $\gamma^*$ . Odmiana  $\gamma^*$  zawiera dodatkowo osiem reszt aminokwasowych w C-końcu łańcucha i jest około 2 kDa cięższa od podjednostki  $\gamma$ . Występowanie dwóch odmian spowodowane jest alternatywnym dojrzewaniem pre-mRNA. Odmiana  $\gamma^*$  powstaje wówczas, gdy siódmy lub ostatni intron pre-mRNA nie zostaje wycięty i ulega translacji wraz z eksonami. W efekcie zachodzi podstawienie czterech ostatnich C-końcowych aminokwasów podjednostki  $\gamma$  przez peptyd złożony z 12 reszt aminokwasowych [8]. Odmiana  $\gamma^*$  jest syntetyzowana w hepatocytach, nato-

miast w megakariocytach jej biosynteza nie zachodzi lub jest znacznie zredukowana. Przypuszcza się, że w procesie dojrzewania pre-mRNA dla podjednostki  $\gamma$  uczestniczą nieznanne dotąd specyficzne czynniki tkankowe [9].

## V. Powstawanie dojrzałych cząsteczek fibrynogenu

### V-1. Regulacja ekspresji genów fibrynogenu

Geny fibrynogenu ulegają ekspresji głównie w komórkach parenchymalnych wątroby, a także w megakariocytach [10]. Synteza fibrynogenu, podobnie jak innych białek „ostrej fazy”, indukowana jest przez liczne czynniki, w tym cytokiny i hormony glukokortykoidowe. Regulacja syntezy fibrynogenu odbywa się na poziomie transkrypcji przez oddziaływanie czynników regulujących transkrypcję z sekwencjami promotorowymi genów dla podjednostek  $\alpha$ ,  $\beta$  i  $\gamma$ .

Zidentyfikowano wiele czynników białkowych regulujących transkrypcję wraz z sekwencjami promotora wykazującymi dla nich powinowactwo. Promotor genu  $\gamma$  zawiera sekwencje wiążące trzy uniwersalne czynniki regulacji transkrypcji: MLTF (ang. *major late transcription factor*), SP1 wiążący się z fragmentem -66 do -53 pz oraz czynnik wiążący sekwencję CAAT *box*, która występuje pomiędzy -51 pz i -46 pz, licząc od miejsca startu transkrypcji [11, 12]. Wiadomo, że stymulujący wpływ deksametazonu na transkrypcję genu podjednostki  $\beta$  powiązany jest w pewien sposób z regionem genu  $\beta$  zlokalizowanym pomiędzy -2900 pz i -1500 pz, licząc od miejsca startu transkrypcji [13]. Szczególnie ważny stymulujący wpływ na ekspresję genów fibrynogenu ma interleukina 6 określana także jako HSF (ang. *hepatocyte stimulating factor*). Fragment promotora genu dla podjednostki  $\beta$  zawarty pomiędzy -150 pz i -82 pz, licząc od miejsca inicjacji transkrypcji, odpowiada za takie działanie interleukiny 6 [13]. W procesie tym bezpośrednio zaangażowana jest sekwencja CTGGGA obecna w promotorach innych białek „ostrej fazy” oraz sekwencja wiążąca jądrowe białka rodziny C/EBP [14]. Efekt interleukiny 6 pośredniczony jest działaniem białka jądrowego, które nazywane jest czynnikiem odpowiedzi ostrej fazy APRF (ang. *acute-phase response factor*). Białko to wiąże się ze wspomnianą sekwencją CTGGGA [15]. Czynnikiem HNF-1 (ang. *hepatic nuclear factor 1*) jest zaangażowany w tkankowo-specyficzną regulację ekspresji genów fibrynogenu dzięki oddziaływaniu z sekwencją zlokalizowaną pomiędzy -89 i -76 pz promotora genu  $\beta$  oraz promotorami genów  $\alpha$  i  $\gamma$  [16].

Regulacja ekspresji genów fibrynogenu odbywa się przede wszystkim na poziomie transkrypcji, chociaż potranskrypcyjne mechanizmy obejmujące zmiany w tempie dojrzewania i transportu mRNA do cytoplazmy mogą również mieć istotne znaczenie dla przebiegu tego procesu [17]. Przemiana mRNA dla

poszczególnych łańcuchów polipeptydowych fibrynogenu jest ściśle skoordynowana i angażuje niescharakteryzowane jeszcze, specyficzne cząsteczki regulatorowe [17]. Stężenie poszczególnych łańcuchów fibrynogenu jest w znacznym stopniu kontrolowane przez estrogeny wpływające na stabilność mRNA. W procesie tym biorą udział sekwencje flankujące sygnał poliadenylacji AAUAAA w cząsteczce mRNA [18]. Transkrypcja genów dla podjednostek  $\alpha$ ,  $\beta$  i  $\gamma$  zachodzi z taką samą prędkością dając równomolowe ilości odpowiednich cząsteczek mRNA [17]. Pomimo odkrycia i opisanego wielu czynników regulujących proces transkrypcji nie jest znany mechanizm regulacji oraz skoordynowania ekspresji genów fibrynogenu.

### V-2. Translacyjne i potranslacyjne procesy składające się na syntezę fibrynogenu

Cząsteczki mRNA dla poszczególnych podjednostek fibrynogenu są transportowane do cytoplazmy, a następnie ulegają translacji na rybosomach siateczki śródplazmatycznej szorstkiej. Pierwotne produkty translacji są formami prekursorowymi polipeptydów A $\alpha$ , B $\beta$  i  $\gamma$ . Zawierają one N-końcowe peptydy sygnałowe zbudowane z 16-30 reszt aminokwasowych. Peptydy sygnałowe biorą bezpośredni udział w procesie kotranslacyjnej translokacji czyli przemieszczenia syntetyzowanych polipeptydów przez błonę siateczki śródplazmatycznej do wnętrza jej cystern. Sekwencje sygnałowe są usuwane kotranslacyjnie przez endopeptydazę, znajdującą się na wewnętrznej powierzchni błony cystern i ulegają proteolizie do wolnych aminokwasów [19, 20]. Kolejną modyfikacją jest glikozylacja podjednostek B $\beta$  i  $\gamma$  [21]. Proces ten polega na kowalencyjnym przyłączeniu łańcucha cukrowego do grupy amidowej asparaginy w pozycji 52 prepeptydu  $\gamma$  oraz 364 prepeptydu B $\beta$ . Glikozylacja podjednostek fibrynogenu zaczyna się podczas wydłużania łańcuchów polipeptydowych w cysternach siateczki śródplazmatycznej szorstkiej i jest kontynuowana w aparacie Golgiego. Ze względu na lokalizację reszt Asn w polipeptydach B $\beta$  i  $\gamma$ , najpierw zachodzi glikozylacja podjednostki  $\gamma$  a potem podjednostki B $\beta$  [20].

Łańcuch A $\alpha$  fibrynogenu izolowanego z osocza krwi zbudowany jest z 610 aminokwasów i zawiera resztę Val jako C-końcówkę. Sekwencja aminokwasowa wynikająca z analizy cDNA dla podjednostki  $\alpha$  jest o 15 reszt aminokwasowych dłuższa, składa się z 625 reszt zakończonych C-końcówką Pro. Przypuszcza się, że podjednostka A $\alpha$  ulega potranslacyjnej modyfikacji polegającej na odcięciu dodatkowych 15 reszt aminokwasowych z C-końca, w procesie ograniczonej proteolizy zachodzącej podczas składania lub sekrecji cząsteczki fibrynogenu [3].

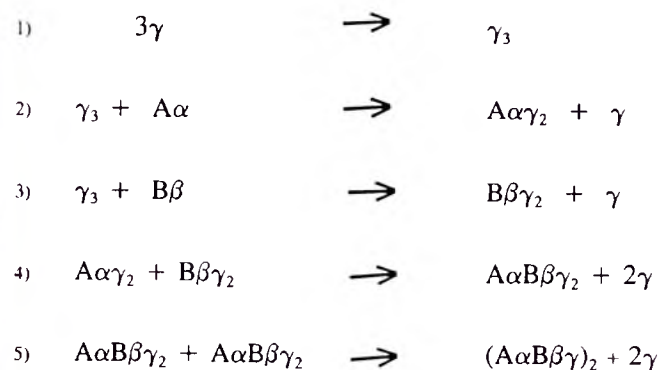
### V-3. Składanie i sekrecja cząsteczki fibrynogenu

Synteza łańcuchów polipeptydowych A $\alpha$ , B $\beta$  i  $\gamma$  oraz

ich składanie w dojrzałą cząsteczkę zachodzi równocześnie w siateczce śródplazmatycznej szorstkiej. Przyłączenie łańcuchów  $A\alpha$  i  $\gamma$ , pochodzących z wewnątrzkomórkowych rezerw, do rosnącego na polisomach łańcucha  $B\beta$  jest pierwszym etapem składania fibrynogenu. W efekcie powstają kompleksy  $A\alpha B\beta$  oraz  $B\beta\gamma$ . Kompleksy te wiążą trzeci łańcuch tworząc strukturę  $(A\alpha B\beta\gamma)$ , która następnie ulega dimeryzacji w cząsteczkę fibrynogenu  $(A\alpha B\beta\gamma)_2$  [22]. Wiadomo, iż szybkość syntezy dojrzałych cząsteczek fibrynogenu ograniczona jest ekspresją genu kodującego strukturę łańcucha  $B\beta$ . Opisano polimorfizm genu  $B\beta$  zlokalizowany w regionie odpowiadającym fragmentowi restrykcyjnemu Bc11. Polimorfizm ten w decydujący sposób wpływa na szybkość syntezy łańcucha  $B\beta$  i w ten sposób, decyduje o poziomie syntezy funkcjonalnie aktywnych cząsteczek fibrynogenu.

W komórkach Hep G2 stwierdzono obecność kilku kompleksów będących prekursorami dojrzałej cząsteczki fibrynogenu a mianowicie  $A\alpha B\beta\gamma_2$  o masie 232 kDa,  $A\alpha\gamma_2$  o masie 150 kDa,  $B\beta\gamma_2$  o masie 135 kDa oraz  $\gamma_3$  o masie 128 kDa. Zakładając, że każdy z nich bierze udział w składaniu cząsteczki fibrynogenu zaproponowano również nieco odmienny mechanizm tego procesu (Ryc. 2). Zgodnie z nim, w pierwszym etapie powstają trimery polipeptydów  $\gamma$ , które łączą się z łańcuchami  $A\alpha$  i  $B\beta$  tworząc odpowiednio kompleksy  $A\alpha\gamma_2$  i  $B\beta\gamma_2$ . W efekcie uwalnia się łańcuch  $\gamma$  (etap 2 i 3). W następnym etapie w reakcję wchodzi kompleksy  $A\alpha\gamma_2$  i  $B\beta\gamma_2$  i jako produkt powstaje kompleks  $A\alpha B\beta\gamma_2$  oraz dwa wolne łańcuchy  $\gamma$ . Końcowy etap polega na dimeryzacji kompleksów  $A\alpha B\beta\gamma_2$  i utworzeniu dojrzałej cząsteczki fibrynogenu  $(A\alpha B\beta\gamma)_2$  z uwolnieniem dwóch łańcuchów  $\gamma$  [23].

W procesie składania i sekrecji cząsteczki fibrynogenu ważną rolę pełnią występujące w niej liczne wiązania disiarczkowe. Symetryczne mostki disiarczkowe obecne przy N-końcu cząsteczki utrzymują dimeryczną strukturę fibrynogenu, natomiast powstanie mostków w C-końcowym regionie cząsteczki jest niezbędne dla prawidłowego wydzielania fibrynogenu przez hepatocyty [24]. Pomimo ścisłej koordynacji ekspresji wszystkich genów fibrynogenu, bliżej nieokreślone zmiany na poziomie potranskrypcyjnym powodują



Ryc. 2. Hipotetyczny mechanizm składania dimerycznej cząsteczki fibrynogenu z łańcuchów  $A\alpha$ ,  $B\beta$  i  $\gamma$ .

pojawienie się nadmiernych ilości łańcuchów fibrynogenu, które ulegają rozkładowi we wnętrzu komórki. Łańcuchy  $B\beta$  i  $\gamma$  rozkładane są w retikulum endoplazmatycznym przy udziale białek BiP (ang. *immunoglobulin heavy chain binding protein*), natomiast łańcuch  $A\alpha$  oraz kompleks  $A\alpha\gamma$  w lizosomach [25]. Fibrynogen ulega sekrecji z hepatocytów do krwioobiegu przy udziale aparatu Golgiego. Obecność niektórych prekursorów cząsteczki fibrynogenu  $A\alpha\gamma_2$ ,  $A\alpha B\beta\gamma_2$  oraz bardzo niewielkich ilości wolnego łańcucha  $A\alpha$  w nadśączach hodowli komórek Hep G2 wskazuje na to, że nie tylko dojrzałe cząsteczki fibrynogenu ulegają sekrecji [23].

Rekapituluując, podobnie jak w przypadku innych białek zbudowanych z kilku łańcuchów polipeptydowych, nie znany jest do końca mechanizm powstawania dojrzałej cząsteczki fibrynogenu. Nie znane są też wszystkie czynniki, które regulują syntezę tego białka i np. wpływają na jego podwyższone stężenie we krwi. Poznanie ich natury oraz wyjaśnienie systemu regulacji ekspresji genów fibrynogenu umożliwi opracowanie metod diagnostycznych i strategii terapeutycznej pomocnej w zapobieganiu i leczeniu zakrzepicy oraz chorób naczyniowo-sercowych.

Artykuł otrzymano 28 grudnia 1994 r.

Zaakceptowano do druku 28 lutego 1995 r.

## Piśmiennictwo

1. Kannel WB, Wolf PA, Castelli WP (1987) *JAMA* **258**: 1138-1186
2. Kant JA, Fornance AJ, Saxe D, Simon MJ, Mc Bride OW, Crabtree GR (1985) *Proc Natl Acad Sci USA* **82**: 2344-2348
3. Rixon MW, Chan WY, Davie EW, Chung DW (1983) *Biochemistry* **22**: 3237-3244
4. Kant JA, Lord ST, Crabtree GR (1983) *Proc Natl Acad Sci USA* **80**: 3953-3957
5. Chung DW, Rixon MW, Que BG, Davie EW (1983) *Ann N Y Acad Sci* **408**: 449-456
6. Chung DW, Que BG, Rixon MW, Mace M, Davie EW (1983) *Biochemistry* **22**: 3244-3250
7. Rixon MW, Chung DW, Davie EW (1985) *Biochemistry* **24**: 2077-2086
8. Chung DW, Chan WY, Davie EW (1983) *Biochemistry* **22**: 3250-3256
9. Haidaris PJ, Francis CW, Sporn LA, Arvan DS, Collichio FA, Marder VJ (1989) *Blood* **74**: 743-750
10. Forman WB, Barnhard MJ (1964) *J Am Med Assoc* **187**: 168-172
11. Crabtree GR, Courtois G, Morgan JG (1987) W: M. Verstraete, Tromb Haemost, Leuven University Press, Leuven
12. Morgan JG, Courtois G, Fourel G, Chodosh LA, Evans E, Crabtree GR (1988) *Mol Cell Biol* **8**: 2628-2637
13. Huber P, Laurent M, Dalmon J (1990) **265**: 5695-5701
14. Dalmon J, Laurent M, Courtois (1993) *Mol Cell Biol* **13**: 1183-1193
15. Wegeneka UM, Buschman J, Leutticken C, Heinrich PC, Horn F (1993) *Mol Cell Biol* **13**: 276-288
16. Humphries SE, Green FR, Thomas AE, Kelleher CH, Meade TW (1991) w: Etiology of Human Disease at the DNA Level, Raven Press
17. Moshage HJ, Kleter BEM, van Pelt JF, Roelofs HMJ, Kleuskens JAGM, Yap SH (1988) *Biochim Biophys Acta* **950**: 450-454

18. Pastori RL, Moskaitis JE, Smith LH, Schoenberg DR, (1990) *Biochemistry* **29**: 2599-2605
19. Nesbitt JE, Fuller GM (1991) *Biochim Biophys Acta* **1089**: 88-94
20. Fuller GM, Nickerson JM, Adams MA (1983) *Ann N Y Acad Sci* **408**: 440-448
21. Nickerson JM, Fuller GM, (1981) *Proc Natl Acad Sci USA* **78**: 303-307
22. Yu S, Sher B, Kudryk B, Redman CM (1984) *J Biol Chem* **259**: 10574-10581
23. Hartwig R, Danishefsky KJ (1991) *J Biol Chem* **266**: 6578-6585
24. Zhang JZ, Redman CM (1994) *J Biol Chem* **269**: 652-658
25. Roy S, Yu S, Banerjee D, Overton O, Mukhopadhyay G, Oddoux C, Grieninger G, Redman C (1992) *J Biol Chem* **267**: 23151-23158

## Białka mozaikowe

## Mosaic proteins

IWONA ŻAK\*

### Spis treści:

- I. Wprowadzenie
- II. Białkowe jednostki modułowe
- III. Struktura modułowa i funkcja białek mozaikowych
  - III-1. Białka mozaikowe adhezji komórek
  - III-2. Białka modułowe działające jako czynniki wzrostowe
  - III-3. Laminina i inne wielodomenowe białka mozaikowe macierzy pozakomórkowej
- IV. Uwagi końcowe
- V. Perspektywy

**Wykaz stosowanych skrótów:** apo(a) — apolipoproteina(a); CCP (ang. *complement control protein*) — białka dopełniacza; ECM (ang. *extracellular matrix*) — macierz pozakomórkowa; EGF (ang. *epidermal growth factor*) — epidermalny czynnik wzrostowy; EGF-podobne — podobne do epidermalnego czynnika wzrostowego; EHS (ang. *Engerlbreth-Holm-Swarm*) — myszy nowotwór (EHS); ELAM-1 (ang. *endothelial-leukocyte adhesion molecule*) — CD62E, czyli selektyna E; ICAM (ang. *intercellular adhesion molecules*) — receptory adhezyjne nadrodziny immunoglobulin endotelium; Ig — immunoglobuliny; IL-2 — interleukina-2; NCAM (ang. *neural cell adhesion molecules*) — receptory adhezyjne nadrodziny Ig komórek nerwowych; NMR (ang. *nuclear magnetic resonance*) — jądrowy rezonans magnetyczny; PDGF (ang. *platelet derived growth factor*) — płytkopochodny czynnik wzrostowy; pro-AR — prekursor amfereguliny; pro-EGF — prekursor epidermalnego czynnika wzrostowego; pro-TGF $\alpha$  (TGF ang. *transforming growth factor*) — prekursor transformującego czynnika wzrostowego- $\alpha$ ; pro-VGF (VGF ang. *vaccinia virus growth factor*) — prekursor czynnika wzrostowego wirusa ospy krowiej (krowianki); SjaLo-Le<sup>x</sup> — granulocytospecyficzny antygen z determinantą: Gal $\beta$ 1.4 (Fuc $\alpha$ 1.3) GlcNAc $\beta$ 1.3 SPR (ang. *serine protease repeat*) — domena proteazy serynowej.

\*Dr, Katedra Biochemii i Chemii Śl. Akademii Medycznej 40-752 Katowice, ul. Medyków 18

### Contents:

- I. Introduction
- II. Modular units of protein
- III. Modular structure and function of some mosaic protein
  - III-1. Cell adhesion mosaic proteins
  - III-2. Modular proteins acting as growth factors
  - III-3. Laminin and other multidomain mosaic proteins of the extracellular matrix
- IV. Concluding remarks
- V. Perspectives

## I. Wprowadzenie

Białka zawierające zestaw kilku modułów peptydowych, spotykanych w dwóch co najmniej różnych białkach, nazywane są białkami mozaikowymi. [1-4]. Poszczególne jednostki modułowe mogą występować pojedynczo lub powtarzać się wielokrotnie (ponad 50 razy), tworząc tzw. tandemy, zarówno w jednym białku oraz w innych, pełniących odmienne funkcje biologiczne w organizmie wielokomórkowym [5-7].

Do wielkiej i fascynującej złożoności białek mozaikowych [1] przyczynił się głównie proces przetasowania eksonów (*exon shuffling*) [4, 8]. Rozbieżna ewolucja z genu wyjściowego na skutek przetasowania eksonów, duplikacji lub delecji uważana jest za stosunkowo szybki i prosty sposób tworzenia zmienności molekularnej. Przymuszczenie kilka tysięcy eksonów byłoby wystarczające do odtworzenia przez przetasowanie eksonowe wszystkich aktualnie znanych białek [9].

Znanych jest obecnie ponad 100 biologicznie różnych białek mozaikowych, nie uwzględniając izoform

<sup>1</sup> Wykład na XXX Zjeździe Pol. Tow. Biochemicznego w Szczecinie, wrzesień 1994.

gatunkowych lub tkankowych [10, 11]. Należy przypuszczać, że lista białek mozaikowych może powiększać się z dnia na dzień dzięki badaniom, które wykorzystują komputery do porównawczych analiz znanych sekwencji aminokwasowych różnych białek.

Białka mozaikowe są powszechne przede wszystkim u zwierząt, choć ostatnio wykryto odpowiednik białka zwierzęcego u roślin [7] (Tab.1). Pojedyncze moduły odnaleziono również w białkach *Prokariota* lub wirusów, ich pochodzenie nie jest ostatecznie wyjaśnione. Sugerowana jest możliwość „poziomego” przeniesienia genu zwierzęcego do bakterii, które go nabywają skutkiem transformacji czy też transdukcji lub transfekcji z pośrednictwem faga [11a]. Zagadnienia ewolucyjnej ruchliwości modułów białkowych szczegółowo przedstawili Doolittle i Bork w polskojęzycznym piśmiennictwie popularnonaukowym [*Świat Nauki* 12: 36-43, 1993], do którego odsyłam zainteresowanych czytelników, gdyż nie są one przedmiotem moich rozważań.

## II. Białkowe jednostki modułowe

Moduł białkowy, to region polipeptydu o sekwencji 40-100 reszt aminokwasowych, o strukturze i funkcji niezależnej od struktury pozostałej części cząsteczki

białkowej, którego filogenetyczne pochodzenie zdeterminowane jest procesem przetasowania eksonowego i duplikacją. Moduły posiadające te cechy są przedmiotem moich rozważań. W piśmiennictwie naukowym termin ten obejmuje różnie nazywane jednostki, mianowicie: powtórzenia (*repeats*), motywy (*motifs*), czy też domeny [2, 3, 11-15]. Krótkie sekwencje aminokwasowe mogą nie mieć wystarczającej liczby wiązań wewnątrzcząsteczkowych do utrzymania trwałej struktury trójwymiarowej (czyli dominującego kształtu), wówczas nie spełniają warunków klasyfikujących je do domen. Z drugiej strony, nie wszystkie domeny należy uznać za moduły, choć wiele modułów posiada cechy domen [3]. Zatem, termin moduł może dotyczyć tego szczególnego rodzaju domeny, której powstanie było następstwem procesu przetasowania eksonów i duplikacji [2-4, 8]. Przyjmuje się, że sekwencje aminokwasowe jednostek modułowych zdolne są do tworzenia trójwymiarowej struktury. Struktura ta może mieć mniej lub bardziej stabilny globularny kształt odmienny od reszty cząsteczki, zależnie od liczby tworzących ją reszt aminokwasowych. Niekiedy do utrzymania dominującej struktury trzeciorzędowej wymagane mogą być dodatkowe czynniki stabilizujące, np. w rodzaju kowalencyjnych wiązań disiarczkowych lub jonów metali.

**Tabela 1.**

Występowanie i ogólna funkcja omawianych w pracy białek mozaikowych.

Występowanie białek Miejsce działania	Funkcja biologiczna białek mozaikowych przykłady		Piśmiennictwo
ROŚLINY KRĘGOWCE przestrzeń pozakomórkowa	niejasna krzepnięcie krwi i regulacja	witronektyna czynniki: XII, X, IX, VII, białka C, S, protrombina czynnik von Willebranda trombospondyna trombomodulina błon komórek endotelialnych plazminogen czynniki: B, C1q, C1r, C1s, C2, C6-C9, perforyna czynniki: H, D, I	[7] [38, 39, 51] [59] [34, 37] [81] [38-40] [11] [18, 27, 34, 35]
ECM, błony podstawne	odpowiedź immunologiczna transport cholesterolu LDL oddziaływania typu: białko-białko, białko-komórka, komórka-komórka	witronektyna properdyna apolipoproteina (a) fibronektyna, perlekan, laminina, nidogen, tenascyna, kolageny V, IX, XI, XII	[7] [34, 36] [40] [19, 21, 22] [45, 46] [52, 53] [54] [41] [55-59]
błony komórkowe	receptory: adhezji, czynników wzrostowych, IL; endocytoza pośred. recept. prekursory cz. wzrostowych	N-CAM, I-CAM, selektyny E, P, L receptor PDGF, receptor interleukiny-2 receptor LDL	[17, 32] [30] [31, 32] [22, 33] [3]
cytoplazma	prekursory cz. wzrostowych białko mięśni poprzecznie prążkowanych	proTGF $\alpha$ , proEGF, proAR tytyna	[48] [10]
BEZKRĘGOWCE błony komórkowe	aktywność: czynników wzrostowych, enzymatyczna	produkty genów Notch, Delta i crumbs drozofili produkty genów lin 12, glp-1 nicienia	[48] [11a]
PROKARIOTA WIRUSY	prekursor rozpuszczalnego czynnika wzrostowego	proVGF — produkt wczesnego genu wirusa ospy krowiej (krowianki)	[48]

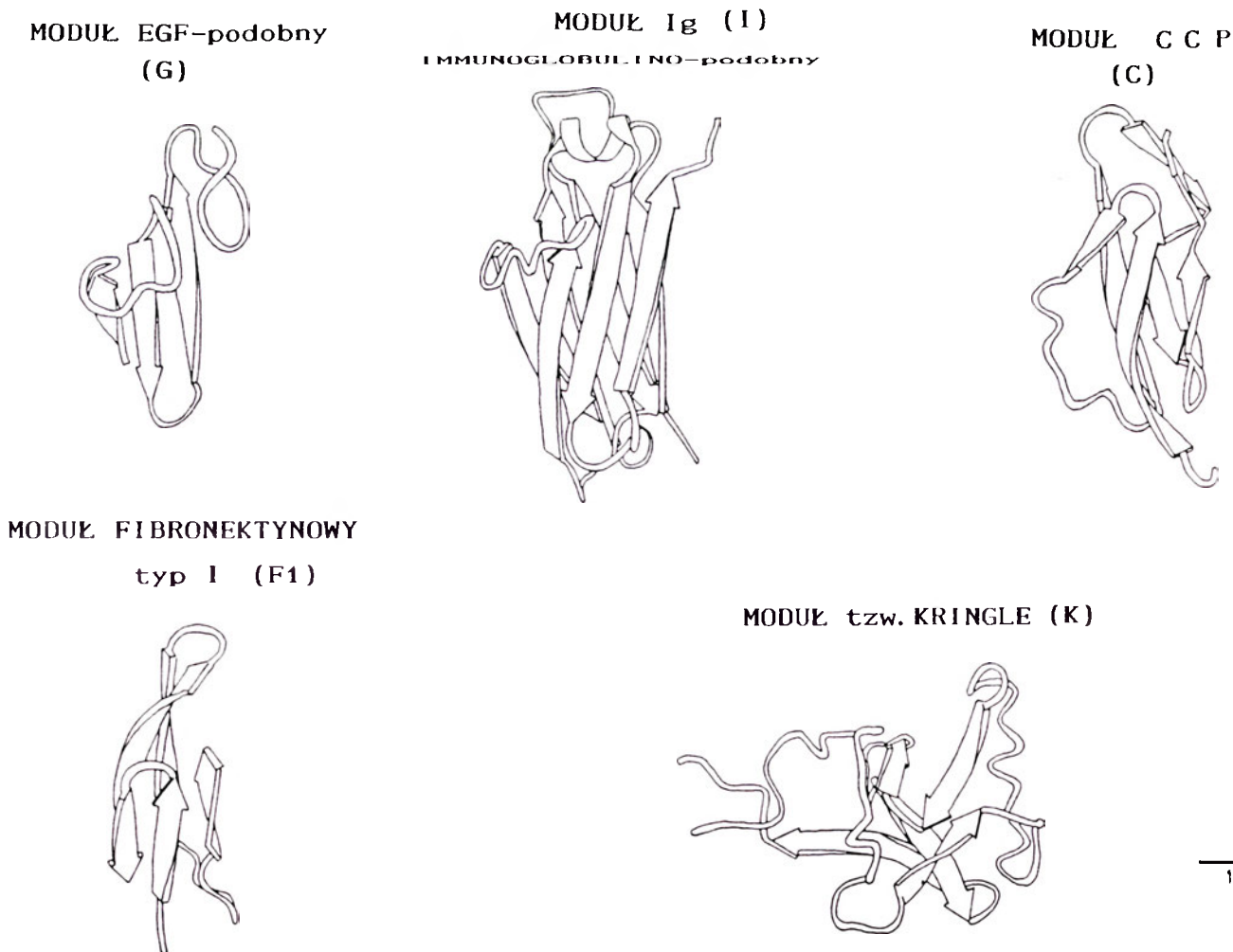
Zwykle mogły odpowiadać pojedynczym eksynom mającym tę samą fazę na granicy intron-ekson [2, 12]. Niektóre, jak np. moduł *kringle*, mogą odpowiadać podwójnemu eksonowi przedzielonemu intronem, jednak zawsze podczas przetasowania przenoszone są razem, skoro dotąd nikt nie znalazł połówki tego modułu w jakimkolwiek innym białku.

Ilość znanych modułów białkowych określona wstępnie na podstawie sekwencji aminokwasowej przekracza wartość 40, z czego jedynie niespełna 15 scharakteryzowano pod względem struktury trzeciorzędowej. W tym znajdują się również moduły nie będące przedmiotem niniejszego opracowania, mianowicie uczestniczące w interakcjach typu białko-DNA, do których należą: motyw palca cynkowego (ang. *zinc finger*), motyw zamka leucynowego (ang. *leucine zipper*) i motyw heliks-skręt-heliks (ang. *helix-turn-helix*) [23-25].

Moduły: podobne do EGF [16], do Ig [17], białek dopełniacza (CCP) [18], fibronektynowe typ I [19] i tzw. *kringle* [20] (Ryc. 1) mają stabilną strukturę trzeciorzędową, która pozostaje zachowana po wyizolowaniu jednostki z natywnego białka [3]. Potwierdza to sugestię, że struktura trzeciorzędowa modułu nie podlega wpływom sąsiadujących sekwencji amino-

kwasowych, które jako towarzyszące są obecnie w typowym białku mozaikowym. Struktura trzeciorzędowa omawianych modułów jest stabilizowana wiązaniami disiarczkowymi, których liczba jest charakterystyczna dla każdego typu. Obecność wiązań disiarczkowych nie jest regułą, powszechne są również moduły, które ich nie zawierają, np. moduł fibronektynowy typu III [21, 22]. Znaczne części struktury pierwszorzędowej omawianych modułów (Ryc. 1) występują w uporządkowanej konformacji. Dominują fragmenty polipeptydu o strukturze  $\beta$ , które poprzedzielane są nieregularnymi luźnymi pętlami. Struktury  $\beta$  o układzie przeciwrównoległym, rzadziej równoległym, tworzą mniej lub bardziej upakowany, stabilny rdzeń modułu, natomiast rejony luźnych pętli znajdują się raczej na powierzchni modułu (Ryc. 1). Powierzchniowo uwidaczniają się reszty aminokwasowe bezpośrednio odpowiedzialne za kontakt z innymi białkami, czyli aminokwasy tworzące tzw. płamki funkcjonalne [3].

Przewaga rejonów o strukturze  $\beta$  jest cechą charakterystyczną dla modułów uczestniczących w oddziaływaniach typu białko-białko [3], natomiast dla modułów uczestniczących w oddziaływaniach typu białko-DNA [23-25] bardziej charakterystyczna jest przewaga rejonów o strukturze  $\alpha$ -heliksu.



Ryc. 1. Schematyczne diagramy pasmowe (*ribbon*) konformacji przestrzennej niektórych modułów [3, 16-20, 27]. Rejony o strukturze  $\beta$  przedstawiono w postaci szerokich płaskich strzałek.



Przedstawione na rycinie 1 moduły należą do powszechnie występujących w różnych rodzajach białek oraz są dobrze scharakteryzowane pod względem struktury trzeciorzędowej. Poszczególne moduły pochodzące z biologicznie różnych białek tworzą rodziny homologicznych jednostek.

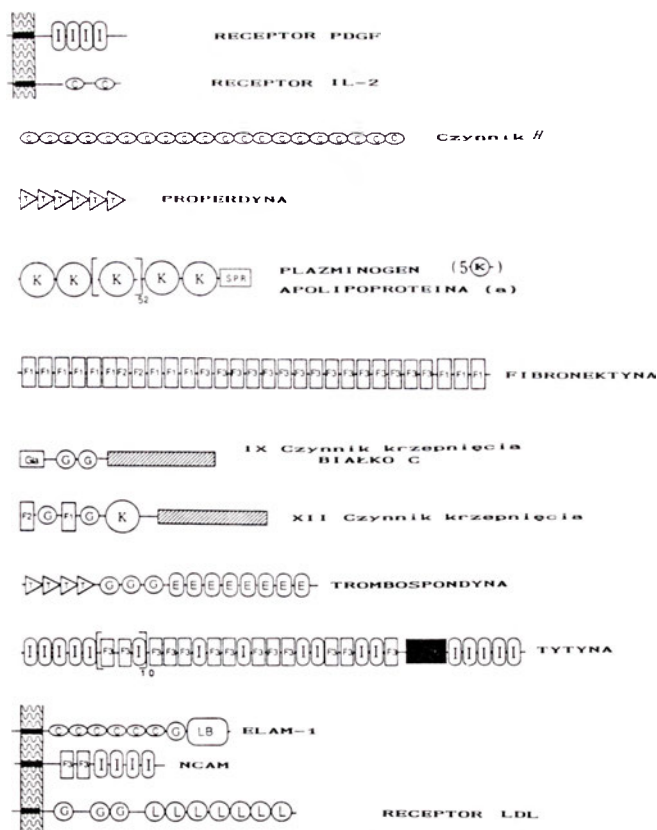
Baron i wsp. [3] sugerują, że homologiczne jednostki modułowe posiadają zgodną strukturę trzeciorzędową (*a consensus structure*) reprezentatywną dla całej rodziny podobnych modułów, przykłady takich konformacji przestrzennych schematycznie przedstawia rycina 1. Częściej jednak w praktyce badawczej o identyfikacji i klasyfikacji danego modułu decyduje zgodna sekwencja aminokwasowa (*a consensus sequence*) [3, 11, 12, 14-16, 19, 26]. Poza zgodną sekwencją, homologia pozostałych fragmentów struktury pierwszorzędowej modułu może być stosunkowo niewielka [3, 11]. Przymuszczenie obecności zgodnej sekwencji aminokwasowej jest wystarczające do determinowania zgodnej struktury trzeciorzędowej, reprezentatywnej dla całej rodziny podobnych modułów [18, 26-28]. Natomiast niehomologiczne fragmenty struktury pierwszorzędowej modułu mogą stanowić odrębne t.zw. plamki funkcjonalne, jak np. w niektórych modułach podobnych do EGF, szerzej omówionych w dalszej części opracowania.

Charakterystyczną cechą większości modułów jest ich szczególna sprawność w rozpoznawaniu i wiązaniu innych białek. Specyficzność oddziaływania typu białko-białko nadaje moduł, który bezpośrednio w kontakcie uczestniczy. Miejscami oddziaływań mogą być np. krótkie sekwencje aminokwasowe rozpoznania adhezyjnego (*adhesive recognition sequences*) [29], które wydają się być eksponowane powierzchniowo na module. Moduły lektynowe, jako jedyne, uczestniczą w międzycząsteczkowych oddziaływaniach za pośrednictwem glikanów, które rozpoznają [30].

### III. Struktura modułowa i funkcja białek mozaikowych

Białka mozaikowe występują pozakomórkowo (ECM) i na terenie błon plazmatycznych, wyjątkowo wewnątrz komórki [10] (Tab. 1). Wśród nich są białka układu krzepnięcia, fibrynolizy, dopełniacza, adhezyjne oraz o aktywności czynników wzrostowych i czynników transkrypcyjnych. Uczestniczą w procesach biologicznych w których bezpośrednio znaczenie mają interakcje typu białko-białko [11] lub białko-DNA. Te ostatnie nie są przedmiotem obecnych rozważań, gdyż wiedza zgromadzona na ich temat wymaga oddzielnego opracowania.

Białka mozaikowe można zróżnicować na jednorodne i różnorodne pod względem występujących w nich modułów (Ryc. 2). Nie tylko w błonowym receptorze płytkochodnego czynnika wzrostowego (PDGF) powtarzają się moduły Ig-podobne [31, 32]. Jednorodnym białkiem jest również receptor inter-



Ryc. 2. Schematycznie przedstawiona modułowa organizacja reprezentatywnych białek mozaikowych [3, 11].

leukiny-2 zawierający jedynie moduły CCP charakterystyczne dla białek dopełniacza [22, 33]. Moduły CCP-podobne mogą tworzyć *tandem* np. w czynniku H [18, 27], który jest przedstawicielem większej grupy podobnych białek należących do negatywnych regulatorów aktywności dopełniacza [34, 35]. Strukturę properdyny tworzy swoisty dla tego białka moduł powtarzający się 6-krotnie; [34, 36] podobny moduł odnaleziono również w trombospondynie (Ryc 2) [34, 37]. Plazminogen i apolipoproteina(a) (apo(a)) [38-40] utworzone są z powtarzających się modułów K, tzw. kringle oraz z domeny proteazy serynowej (SPR). Te dwa białka, zasadniczo odmienne pod względem funkcji, strukturalnie różnią się głównie ilością modułów typu *kringle*. W plazminogenie jest ich pięć, natomiast w apo(a) moduł ten powtarza się aż 56 razy. Apo(a) z zachowaną zdolnością niezaktywowanego plazminogenu do wiązania fibryny może przyczyniać się do ukierunkowywania transportu cholesterolu LDL do miejsc mikrourazu, gdzie rozpoczynają się procesy naprawcze i zwiększa zapotrzebowanie na cholesterol, będący składnikiem błon.

Fibronektyna (Ryc. 2) jest prototypem białka adhezyjnego, którego pojedynczy polipeptyd składa się z kilkunastu powtarzających się sekwencji trzech rodzajów modułów fibronektynowych typu I, II i III, o długości odpowiednio wynoszącej 45, 60, 100 reszt aminokwasów [19, 21, 22]. Fibronektynopodobne moduły obecne są również w innych białkach ECM [41], lecz nie tylko, gdyż występują również w wewnątrzkomórkowej tytynie [10], w błonowych recep-

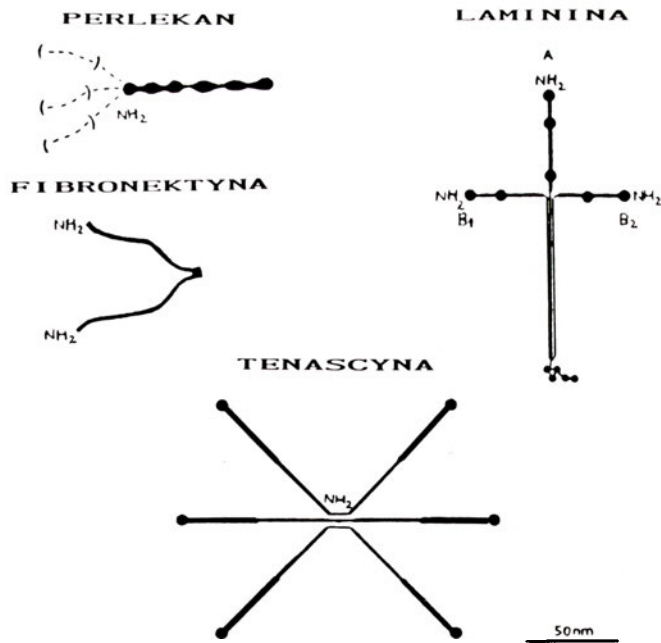
torach adhezyjnych [17, 32], w czynniku XII krzepnięcia i protrombinie [38, 39] (Ryc. 2).

Zwykle białka integralne błon plazmatycznych zawierają trzy typowe domeny, mianowicie: cytoplazmatyczną, przezbłonową i pozakomórkową, jeśli jednocześnie prezentują budowę mozaikową to szczególnie w rejonie tej ostatniej domeny (Ryc. 2). Natomiast większość pozakomórkowych białek mozaikowych ma w całości budowę modułową, tak jak np. fibronektyna, trombospondyna (Ryc. 2), czy perlekan [45, 46].

Białka mozaikowe, głównie pochodzące z macierzy pozakomórkowej, wykazują zdolność do samoagregacji. Wiele z nich, poza postaciami monomerycznymi, jak np. perlekan, występuje w formach wielocząsteczkowych (Ryc. 3) składających się z kilku polipeptydów, mianowicie: jako postaci dimeryczne, np. fibronektyna; trimeryczne, np. laminina, czy też heksameryczne, np. tenascyna. Różne izoformy tego samego białka specyficzne pod względem lokalizacji tkankowej czy też etapu ontogenezy różnią się w ostatecznej swej postaci liczbą oraz kombinacją poszczególnych łańcuchów mogących asocjować do struktur wielopodjednostkowych. Zatem choć kompletne białko jest np. heksameryczne, to może również występować pod postacią trimeryczną, dimeryczną, czy też monomeryczną. Natomiast heterogenność poszczególnych populacji pojedynczych polipeptydów przypuszczalnie wynika z alternatywnego składania mRNA (*splicing mRNA*) [21, 22, 77]. Niepowtarzalny, rozpostarty (*extended*) kształt (Ryc. 3) wielopodjednostkowych białek mozaikowych jest doskonale dopasowany do ich wspólnej własności, jaką jest zdolność do wielokrotnych oddziaływań typu białko-białko. Kształt ten sprzyja łączeniu odległych miejsc powierzchni komórek z innymi białkami macierzy pozakomórkowej. Ponadto, dodatkowo zwielokrotnia ilość możliwych miejsc kontaktu skutkiem asocjacji kilku polipeptydów do ostatecznego rozpostartego kształtu.

### III-1. Białka mozaikowe adhezji komórek

Błonowe receptory adhezyjne [17, 30], mianowicie selektyny (np. ELAM-1) i receptory z nadrodziny immunoglobulin (np. I-CAM), zależnie od aktualnego stanu czynnościowego endotelium i leukocytów, mogą być ujawniane na powierzchni tych komórek. Znane są trzy typy selektyn, mianowicie L, P, i E, wszystkie one są wapnio-zależnymi lektynami, których ligandami są jednostki oligosacharydowe np. z determinantami sialo-Le<sup>x</sup> [42]. Promują rekrutację leukocytów z krwi i toczenie tych komórek po endotelium. Selektyna E, czyli ELAM-1 (Ryc. 2) zbudowana jest z terminalnego modułu lektynopodobnego zależnego od wapnia, pojedynczego modułu EGF-podobnego i kilku modułów CCP, typu białek dopełniacza. Ekspresja tej selektyny na powierzchni endotelium następuje ze znacznym opóźnieniem w porównaniu z pojawieniem się selektyny P, np. podczas utrzymującego się stanu zapal-

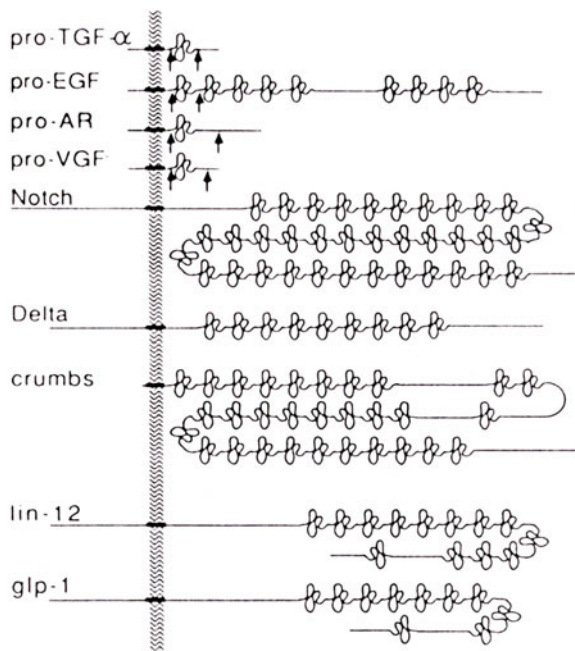


Ryc. 3. Kształty podjednostkowych, wielodomennych białek mozaikowych, przedstawione schematycznie [22, 41, 45, 53].

nego, wzmagając i przedłużając rekrutację leukocytów [43]. W receptorozależnej rekrutacji i adhezji leukocytów do aktywnego śródbłonka, umożliwiającej pokonanie bariery endotelialnej przez te komórki, uczestniczą również śródbłonkowe receptory adhezyjne nadrodziny immunoglobulin, które podobnie jak N-CAM (Ryc. 2) są białkami mozaikowymi, określanymi I-CAM, których przeciweceptorami są leukocytarne integryny- $\beta_2$  [44]. Funkcjonalne oddziaływanie I-CAM ze swymi przeciweceptorami integrynowymi na powierzchni leukocytów gwarantuje adhezję tych komórek do endotelium w stopniu wystarczającym do pokonania bariery śródbłonkowej.

### III-2 Białka modułowe działające jako czynniki wzrostowe

Wśród białek zawierających powtórzenia EGF-podobne znajduje się grupa białek, które poprzez specyficzne oddziaływania białko-białko wytyczają wzrost i różnicowanie komórek. Należą do nich przedstawione na rycinie 4 formy prekursorowe: transformującego czynnika wzrostowego- $\alpha$  (pro-TGF- $\alpha$ ), epidermalnego czynnika wzrostowego (pro-EGF), amfifreguliny (pro-AR), czynnika wzrostowego wirusa ospy krowiej (proVGF), oraz produkty genów: *Notch*, *Delta* i *crumbs Drosophila melanogaster* lub genów *lin-12* i *glp-1* nicienia *Caenorhabditis elegans* [48]. Wszystkie są integralnymi białkami błonowymi o pozakomórkowych domenach mających modułową strukturę utworzoną z EGF-podobnych jednostek, które mogą powtarzać się tylko raz, jak w pro-TGF- $\alpha$ , pro-AR i pro-VGF, lub też wiele razy, jak w pro-EGF i białkach bezkręgowców. Pro-TGF- $\alpha$  i wszystkie produkty genów bezkręgowców (Ryc. 4) ujawniają swą aktywność biologiczną w formie związanej z błoną, pozostałe



#### β MODUŁ EGF-podobny

**Ryc. 4.** Czynniki wzrostowe jako wielomodułowe białka zakotwiczone w błonie plazmatycznej [cyt. za 48, zmodyfikowane]. Strzałki wskazują miejsca proteolizy.

natomiast dopiero po uwolnieniu z powierzchni błony jako formy niskocząsteczkowe, rozpuszczalne, zatem przenikliwe czynniki.

Epidermalny czynnik wzrostowy (EGF), prototypowy mitogen [49], jest pojedynczym modułem składającym się z 53 reszt aminokwasowych [16]. Wykazuje stabilną strukturę trzeciorzędową, która utrzymywana jest trzema wiązaniami disiarczkowymi. Ten rozpuszczalny czynnik wzrostowy powstaje z formy prekursorowej proEGF (Ryc. 4), która w swej domenie pozakomórkowej zawiera 9 EGF-podobnych jednostek. Tylko jeden moduł jest flankowany z dwóch stron aminokwasami Arg lub Lys, wobec których specyficzna jest enteropeptydaza argininowa, przypuszczalnie odpowiedzialna za uwalnianie EGF z powierzchni komórki (Ryc. 4 — strzałki wskazują miejsca ograniczonej proteolizy) [50]. Dotychczas nie wyjaśnione jest znaczenie fizjologiczne i losy uwolnionego jednocześnie polipeptydu zawierającego pozostałe EGF-podobne powtórzenia. Sugeruje się, że pozostałe moduły mają zawierać zgodne sekwencje, które warunkują β-hydroksylację reszty asparaginowej lub asparaginia- nowej i przypuszczalnie są odpowiedzialne za tworzenie miejsc o wysokim powinowactwie do wiązania wapnia [51].

Pokrewny TGF-α, w przeciwieństwie do pro-EGF, przejawia aktywność czynnika wzrostowego, zarówno w formie prekursorowej związanej z błoną plazmatyczną, jak również w formie rozpuszczalnej, po uwolnieniu na drodze ograniczonej proteolizy skutkiem działania enzymu elastazo-podobnego (Ryc. 4 — strzałki wskazują miejsca ograniczonej proteolizy) [48]. Produkty genów bezkręgowców zawierające moduły

EGF-podobne są integralnymi białkami błonowymi, które funkcjonują jako nierozpuszczalne (niepenetrujące) czynniki wzrostowe i nieznane są odpowiadające im formy rozpuszczalne u tych zwierząt [48].

Rodzinę EGF-podobnych modułów ocenia się obecnie na około 500 jednostek [11] odnalezionych w wielu innych białkach (Ryc. 2), których ujawniona aktywność biologiczna różni się od aktywności czynnika wzrostowego. W homologicznych modułach EGF-podobnych sekwencje identyczne stanowią jedynie około 26% [3] i praktycznie żadna z pozycji mostków disiarczkowych nie pozostaje całkowicie zachowana [11]. Moduły te różnią się zdolnością do wiązania ze specyficznym receptorem EGF, który jest przez błonową tyrozynową kinazą białkową aktywowaną ligandem, pośredniczącym w przekazie sygnału mitogennego do wnętrza komórki [16, 49]. Cecha ta pozwala zróżnicować moduły EGF-podobne na dwie skrajne grupy, mianowicie wiążące się lub nie ze swoim receptorem. Wszystkie te moduły, które łączą się z receptorem EGF mają bardzo zbliżoną strukturę przestrzenną. Przypuszczalnie wszystkie one posiadają płamkę funkcjonalną odpowiedzialną za interakcję czynnika wzrostowego z receptorem EGF [3]. Płamkę tę tworzą reszty aminokwasowe pochodzące z różnych pętli strukturalnych modułu EGF. Ukierunkowana mutageneza sekwencji obszaru tej płamki funkcjonalnej dowiodła, że np. zamiana reszty Leu-47 przyczynia się do zaburzenia wiązania czynnika wzrostowego z receptorem przy niewielkiej lokalnej zmianie struktury, natomiast inne mutacje mogą zaburzać zarówno wiązanie, jak i strukturę przestrzenną tego modułu [3].

Wśród modułów EGF-podobnych nie wykazujących zdolności do wiązania się z receptorem EGF są takie, jak np. pierwszy z czynnika IX krzepnięcia (Ryc. 2), które prezentują bardzo podobne pofałdowanie polipeptydu jak czynnik wzrostowy [51]. Fakt ten ma wspierać koncepcję zakładającą, że istnieje zgodna struktura danego typu modułu, która może być wykorzystana do modelowania innych homologów, choć one ujawniają odmienne aktywności [3, 26-28]. Moduł EGF-podobny z czynnika IX krzepnięcia, poza typową zgodną sekwencją, zawiera również sekwencję w rejonie N-końca polipeptydu, która tworzy płamkę funkcjonalną odpowiedzialną za wiązanie jonów  $Ca^{++}$ , i w przypadku czynnika IX jest ważna w ujawnianiu jego aktywności krzepliwej [51]. Ukierunkowana mutageneza pojedynczych aminokwasów z obszaru tej płamki zmienia powinowactwo do wapnia. Sekwencja tworząca miejsca o wysokim powinowactwie wiązania jonów  $Ca^{++}$  w modułach EGF-podobnych ma być obecna nie tylko w tych pochodzących z czynników krzepnięcia, ale również w modułach EGF-podobnych pochodzących z innych białek, między innymi z antykrzepliwej trombomoduliny, receptora LDL, czy latentnego białka wiążącego TGFβ1 [48]. Sugeruje się również, że moduły EGF-podobne z bia-

łek *Notch* i *Delta* pośredniczą w oddziaływaniach zależnych od wapnia, które wytyczają rozwój neurogeny zarodków much.

Szczególne znaczenie biologiczne może mieć fakt, że niektóre moduły mogą uczestniczyć w sygnalizacji komórkowej jako formy rozpuszczalne, czyli czynniki przenikliwe, oraz jednocześnie jako formy zakotwiczone w błonie. Błonowe czynniki wzrostowe łącząc się ze specyficznymi receptorami na powierzchni innej komórki mogą podtrzymywać przyleganie komórek i jednocześnie pośrednicząc w ich stymulacji justakrynej (*juxtacrine stimulation*) czyli poprzez kontakt komórka-komórka [48]. Natomiast uwolnienie ich z powierzchni błony dostarcza rozpuszczalnych, przenikliwych czynników wzrostowych i być może osłabia przyleganie komórek. Obecnie nie można jeszcze jednoznacznie odpowiedzieć na pytanie, czy podobne możliwości mają moduły EGF-podobne obecne w innych białkach mozaikowych, szczególnie ECM. Wiedza w tym zakresie jest skromna, obecnie w wielu ośrodkach prowadzone są badania, które przypuszczalnie pozwolą w przyszłości wyjaśnić ten problem.

### III-3. Laminina i inne wielodomenowe białka mozaikowe macierzy pozakomórkowej

Macierz pozakomórkową w większości tworzą glikoproteiny [21, 22, 41, 45, 52-55]. Są one syntetyzowane w określonym czasie i miejscu podczas rozwoju embrionalnego oraz mają ściśle ustalone rozmieszczenie w dojrzałych tkankach, jak się wydaje, charakterystyczne dla różnych izoform.

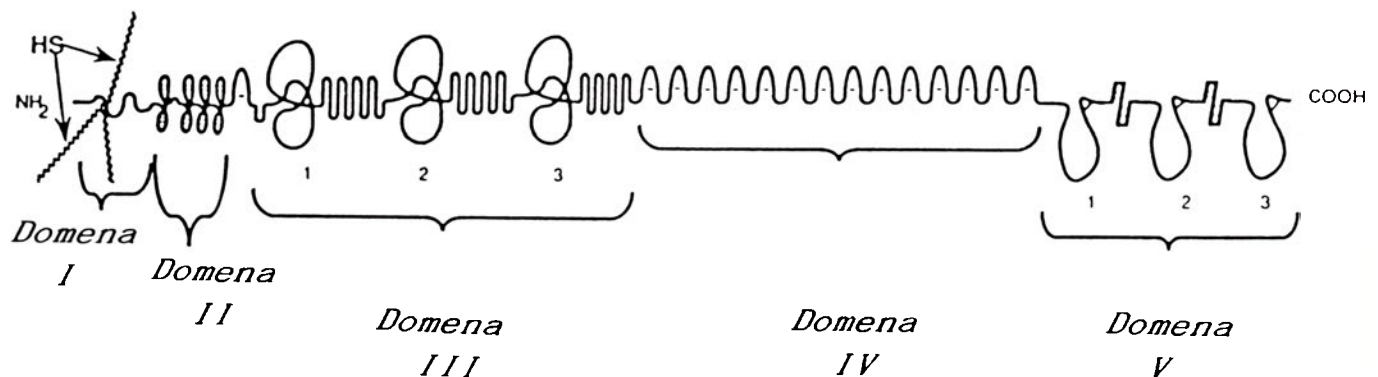
Wiele glikoprotein to typowe białka mozaikowe, w tym kolageny [55-59], które należą do najpowszechniejszych białek zwierzęcych. Domeny obecne w niektórych kolagenach, mianowicie: typu V, IX, XI i XII są homologiczne z domeną wiążącą heparynę pochodzącą z trombospondyny, natomiast moduły obecne w kolagenie VII są homologiczne z modułem fibronektynowym typu III, inny z modułem czynnika von Willebranda typ A [59]. Perlekan jest proteoglikanem siarczanu heparanu, który charakteryzuje się

dużą różnorodnością modułów w nim występujących [45, 46]. Tworzy go pięć domen, z których każda zawiera wewnętrzne powtórzenia (Ryc. 5). Domena I występuje we wszystkich proteoglikanach, gdyż jest nośnikiem glikoaminoglikanów. W perlekanie stanowi ją N-końcowa sekwencja sygnałowa po której następuje 172 aminokwasowy segment, zawierający trzy miejsca do przyłączenia 3 łańcuchów siarczanu heparanu. Domena II zawiera moduły L, które są podobne do tych występujących w receptorze-LDL (patrz Ryc. 2). Domena III ma budowę podobną do krótkiego ramienia łańcucha A lamininy (patrz dalej, Ryc. 6). Domena IV zawiera 14 modułów Ig-podobnych, które w większości są bardzo zbliżone do tych, które są obecne w N-CAM. Domena V zawiera trzy powtórzenia podobne do globularnych domen G regionu C-końca łańcucha A, które ponadto są poprzedzane modułami EGF-podobnymi, których brak w tym położeniu w łańcuchu A lamininy (Ryc. 5) [45]. Różnorodność domen w perlekanie leży u podstaw możliwości uczestnictwa tego białka w wielorakich oddziaływaniach z innymi białkami ECM, jak również z komórkami, m.in. za pośrednictwem integryn grupy  $\beta 1$  i  $\beta 3$  [47], które mają znaczenie podczas tworzenia nadmolekularnej organizacji macierzy pozakomórkowej.

Laminina wraz z kolagenem IV, perlekanem i nidogenem tworzą wyspecjalizowaną formę ECM, jaką są błony podstawne, na których wspierają się śródbłonki [55]. Białka ECM spełniają dwojaką rolę. Z jednej strony bezpośrednio uczestniczą w powstawaniu „złączy” w trakcie tworzenia nadmolekularnej organizacji macierzy, a z drugiej zaś strony wchodzi w kontakt z komórkami, promując i regulując swoiste funkcje komórkowe, jak adhezja, migracja, wzrost, proliferacja lub różnicowanie [43, 44].

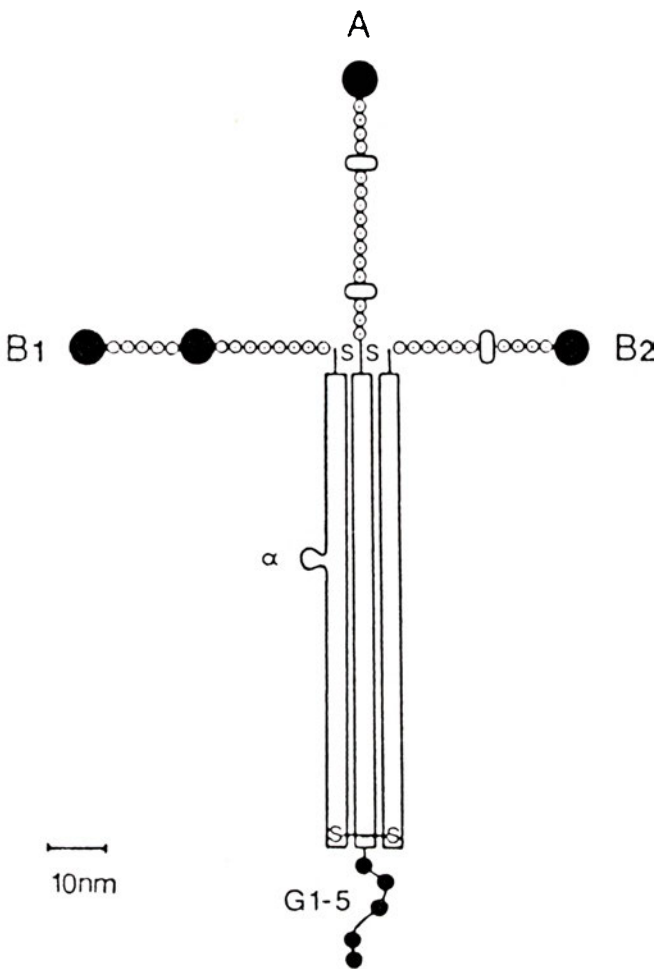
Laminina jest głównym białkiem mozaikowym błon podstawnych [52, 53]. Ma charakterystyczną krzyżową strukturę (Ryc. 6), z jednym długim i trzema krótkimi ramionami, utworzoną z trzech homologicznych polipeptydów A, B1 i B2. Krótkie ramiona stanowią N-końcowe fragmenty poszczególnych polipeptydów, w których znajdują się domeny globularne,

### PERLEKAN



Ryc. 5. Organizacja modułowa i domenowa struktury perlekanu [45].

## LAMININA



Ryc. 6. Schematyczna struktura lamininy mysiego nowotworu EHS [cyt. za 53]

po 2 w ramionach B oraz 3 w ramieniu krótkim A, poprzedzielane tandemami powtarzających się modułów EGF-podobnych, które są regionami wysoko konserwatywnymi w lamininach różnego pochodzenia [52]. We wszystkich trzech łańcuchach dalej następuje długi region polipeptydu zawierający 86 powtórzeń siedmioaminokwasowych motywów obecnych również w innych białkach, których dwa lub trzy polipeptydy lub ich fragmenty bogate w  $\alpha$ -helikalne rejony, zwijają się wokół siebie w pałeczkowaty superheliks [60-62]. W lamininie domena typu *coiled-coil* spina trzy polipeptydy w pałeczkowate długie ramie. Rejon odpowiedzialny za samo-składanie (*self-assembly*) trzech łańcuchów polipeptydowych lamininy znajduje się w N-końcowym fragmencie łańcucha B1 [63]. Specyficzny skład i sekwencja powtarzających się 7-aminokwasowych motywów (mianowicie, aminokwasy: 1 i 4- są hydrofobowe, 2 i 3 — polarne, 5 i 7 — obdarzone ładunkiem, 6 przedzielający — jest polarny)  $\alpha$ -helikalnych rejonów polipeptydowych tworzących domenę superhelikalną sprawia, że w środku struktury *coiled-coil* znajdują się aminokwasy hydrofobowe, natomiast hydrofilne są wystawione na powierzchnię, co w najistotniejszym stopniu stabilizuje tę

formę. Poza oddziaływaniami hydrofobowymi i jonowymi, które stabilizują tę strukturę, łańcuchy lamininy połączone są również mostkami disiarczkowymi ulokowanymi na obu końcach domeny *coiled-coil*, czyli na końcach długiego ramienia [52, 53]. Łańcuch A lamininy jest dłuższy od pozostałych łańcuchów i na jego C-końcu znajduje się pięć globularnych domen G o strukturze  $\beta$ , które są homologiczne z domenami obecnymi w globulinie wiążącej hormony płciowe [52, 53] i z domenami produktu genu *crumbs Drosophila* [64].

Laminina uczestniczy w licznych interakcjach z innymi białkami ECM, między innymi z nidogenem [54], białkiem mozaikowym o kształcie hantli, z którym tworzy kompleks w stosunku 1:1 o bardzo dużej stabilności. Miejsce wiązania nidogenu znajduje się przy wewnętrznym tandemie modułów EGF-podobnych krótkiego ramienia B2 [52, 53]. Związany nidogen jest widoczny w mikroskopie elektronowym jako czwarte krótkie ramie lamininy. Nidogen wiąże się specyficznie z kolagenem IV i perlekanem i może stanowić pomost pomiędzy siecią kolagenu, lamininą i perlekanem [54]. Laminina również bezpośrednio oddziałuje z kolagenem IV. Miejsca wiążące kolagen zlokalizowane są w N-końcowych domenach globularnych łańcuchów B [65]. Większość oddziaływań, w których uczestniczą omawiane białka, przypuszczalnie zachodzi poprzez kontakt specyficznych sekwencji aminokwasowych, ale nie jest to jedyny możliwy sposób, ponieważ laminina może również oddziaływać z innymi białkami za pośrednictwem łańcuchów węglowodanowych. Oddziaływania te mogą być dwóch rodzajów, mianowicie z jednej strony fragment polipeptydu lamininy może wykazywać aktywność lektynopodobną i wiązać specyficznie węglowodany pochodzące z innej makrocząsteczki, jak to jest w przypadku wiązania heparyny lub siarczanu heparanu, bądź też łańcuchy węglowodanowe lamininy mogą być rozpoznawane przez inne białka lektynopodobne. Interakcje lamininy z łańcuchami glikoaminoglikanowymi siarczanu heparanu, proteoglikanów macierzy błon podstawnych, np. perlekanu, lub też przezłonowych typu syndekan, zachodzą poprzez miejsca w rejonie C-końcowym łańcucha A lamininy, szczególnie dwóch ostatnich globularnych domen G (Ryc. 6) [66]. Natomiast łańcuchy węglowodanowe lamininy są rozpoznawane przez nieintegrynowe składniki powierzchni komórkowej [67]. Przypuszczalnie jest to białko posiadające zarówno miejsca lektynopodobne rozpoznające galaktozydy, głównie jednostek poli-N- acetylolaktozoaminowych, oraz miejsca wiążące peptydy [68-71].

System oddziaływań, w których uczestniczy laminina wraz z innymi białkami, niezależnie czy za pośrednictwem łańcuchów polipeptydowych czy też węglowodanowych, leży u podstaw tworzenia i utrzymywania ponadmolekularnej organizacji macierzy oraz u podstaw jej integracji z komórkami. W zespalaniu

komórek z macierzą pozakomórkową, do sieci wzajemnych oddziaływań między białkami macierzy włączają się również pozakomórkowe domeny białek błonowych, które mając modułową budowę mogą ujawnić wiele różnych miejsc możliwego kontaktu. Funkcje komórkowe białek ECM wymagają oddziaływań z pośrednictwem receptorów komórkowych, których funkcja rozciąga się na cytoszkielet komórki i które uczestniczą w sygnalizacji komórkowej (*cell signaling*). Funkcje te spełniają receptory adhezyjne należące do integrzyn, których pozakomórkowe domeny  $\alpha\beta$  wspólnie rozpoznają białka macierzy pozakomórkowej, zaś domeny cytoplazmatyczne z pomocą taliny i innych białek oddziałują z systemem filamentów aktynowych. Receptory te pośredniczą w sygnalizacji komórkowej wrażliwej zarówno na informację napływającą z wnętrza jak i z poza komórki [43, 44]. Niektóre komórki dla ścisłego kontaktu z błoną podstawną tworzą hemidesmosomy [72], gdzie koncentrują się integryny, które mogą pośredniczyć w tych oddziaływaniach [73].

Ostatnio bierze się również pod uwagę, że łańcuchy węglowodanowe lamininy mogą być rozpoznawane przez receptory lektynowe pośredniczące w sygnalizacji komórkowej [74, 75].

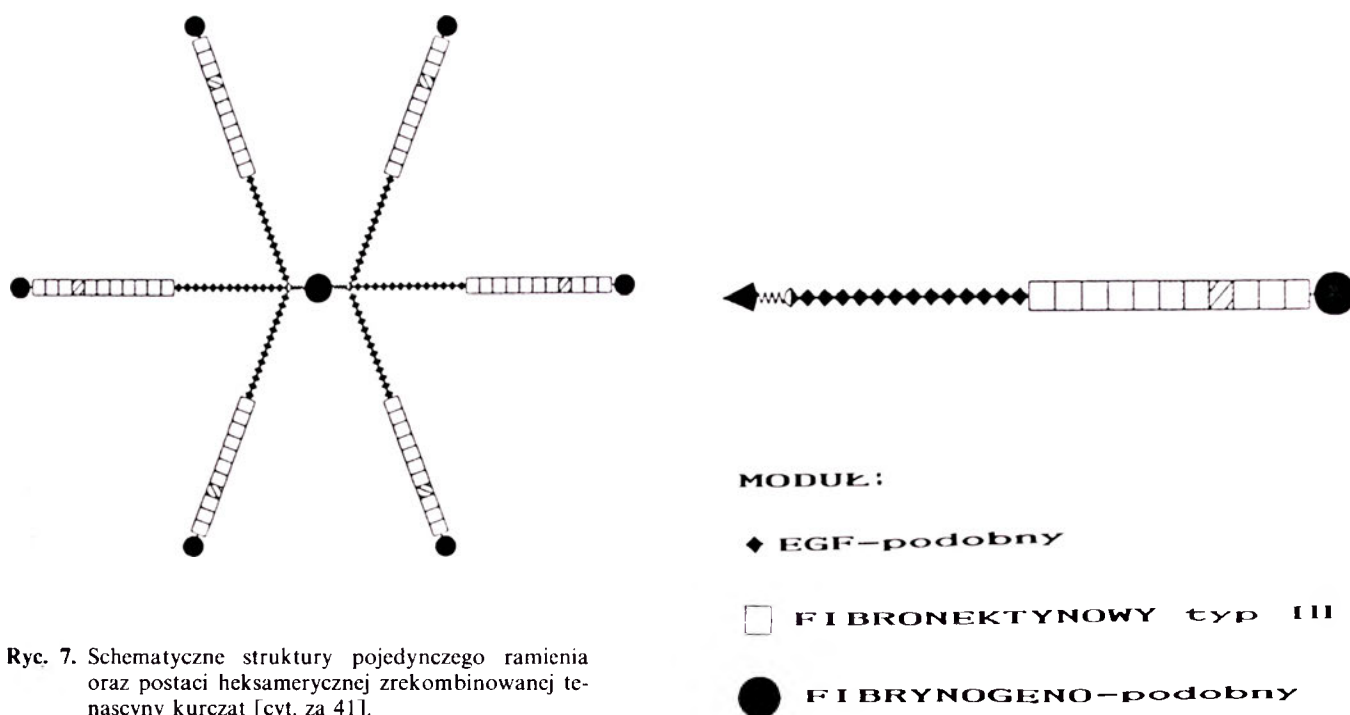
Znane są liczne integryny specyficzne dla fibronektyny (np.  $\alpha5\beta1$ ) i kolagenów (np.  $\alpha2\beta1$ ) [44]. Fibronektyna zawiera wiele sekwencji specyficznego rozpoznania (np. RDG, RGE, LDV, REDV), które mogą oddziaływać z kilkoma różnymi receptorami integrzynowymi [29], być może również zawiera sekwencje rozpoznawane przez inne receptory zdolne do sygnalizacji komórkowej, nie będące integrzynami [71]. Cecha ta nie jest charakterystyczna jedynie dla stosun-

kowo dobrze poznanej fibronektyny, raczej większość białek mozaikowych ECM wydaje się prezentować wiele różnorodnych miejsc, zarówno pro- jak i przeciwdhezyjnych.

Dotychczas opisano co najmniej 6 integrzyn wiążących lamininę, mianowicie integryny:  $\alpha1\beta1$ ,  $\alpha2\beta1$ ,  $\alpha3\beta1$ ,  $\alpha6\beta1$ ,  $\alpha v\beta3$ ,  $\alpha6\beta4$  [75]. Wiedza na temat miejsc rozpoznawania dla wszystkich tych receptorów jest jeszcze niepełna. Są to krótkie adhezyjne sekwencje, zarówno RGD-zależne, jak i RGD-niezależne [29, 44]. Często poza zgodnymi krótkimi sekwencjami w rozpoznawaniu znaczenie mają tzw. synergistyczne sekwencje okoliczne, a również i struktura przestrzenna. W lamininie przede wszystkim całe jej długie ramię odpowiedzialne jest za przyczepianie komórek, choć ważne miejsca kontaktu z komórkami poprzez sekwencje RGD- niezależne znajdują się w części bliższej C-końca domeny *coiled-coil* długiego ramienia i w trzech następujących dalej domenach globularnych G. Natomiast sekwencje RGD-zależne znajdują się w rejonie krótkich ramion lamininy [52, 53]. Ponadto w krótkich ramionach znajdują się miejsca sygnalizacji komórkowej o działaniu mitogennym lamininy. Moduły EGF-podobne obecne w lamininie mogą ujawniać aktywność czynnika wzrostowego, promując podział komórki [52, 53].

Inne białko macierzy pozakomórkowej, heksameryczna tenascyna [41, 76-78] (Ryc. 7), wyróżnia się nie tylko swym niepowtarzalnym kształtem, lecz również wszechstronnością i zmiennością swych właściwości. Funkcjonuje jako białko adhezyjne lub przeciwdhezyjne. Cecha ta może wynikać z współistnienia dwóch przeciwstawnych sygnałów na tym samym białku [41]. Miejsca odpowiedzialne za przyczepianie

## TENASCYNA



Ryc. 7. Schematyczne struktury pojedynczego ramienia oraz postaci heksamerycznej zrekombinowanej tenascyny kurczątków [cyt. za 41].

komórek znajdują się przy końcach sześciu ramion tenascyny, w obrębie modułów fibronektynowych typu III. Natomiast domena, która zawiera 13,5 powtarzających się modułów EGF-podobnych wykazuje działanie antyadhezyjne [41].

Obecność w pozakomórkowej macierzy i w błonach plazmatycznych białek mozaikowych z różnymi zestawami jednostek modułowych, które zawierają różne miejsca rozpoznania i wiązania biologicznego, sprawia że poszczególne makrocząsteczki białek są wiązane przez różne receptory błonowe i jednocześnie pozostają w kontakcie z innymi białkami ECM. W ten sposób może być tworzona sieć strukturalno-funkcjonalnych złożonych oddziaływań typu białko-komórka, białko-białko, czy też komórka-komórka. Wydaje się, że sugerowana sieć wzajemnych interakcji utrzymuje nie tylko lokalną architekturę tkanki, ale również może determinować jej aktualną aktywność biologiczną.

#### IV. Uwagi końcowe

Prace nad strukturą i funkcją dużych białek prowadzone są z dużą intensywnością. Badania ostatnich lat pozwoliły poznać ogólną strukturę białek mozaikowych, niektóre szczegółowo scharakteryzowano pod względem struktury drugo- i trzeciorzędowej, większość jednak opisano na podstawie znanej sekwencji aminokwasowej, która odnosi się do sekwencji modułów innych białek, lepiej poznanych. Funkcje pojedynczych białek mozaikowych są znane. Nadal jednak niejasne jest znaczenie obecności w białkach mozaikowych dodatkowych modułów towarzyszących temu, który determinuje ostateczną funkcję całego białka. Skoro obecnie utrzymuje się pogląd, że jednostki modułowe zachowują swą funkcję w białkach, w których się pojawiają, mimo, że funkcje te czasami mogą ulec zmianie skutkiem przetasowania eksonowego [2], to budowa mozaikowa może stanowić molekularną podstawę potencjalnej wielofunkcyjności białek w których występują różne moduły. Powyższa sugestia może być prawdopodobna również w świetle innej proponowanej roli dla towarzyszących modułów. Mianowicie, że pełnią funkcje czysto strukturalnych odstępników odpowiedzialnych za umieszczenie funkcjonalnego modułu we właściwej mu pozycji umożliwiającej optymalne ujawnienie jego aktywności biologicznej. Nie wyklucza to możliwości funkcjonowania domniemanych odstępników jednocześnie jako nośników latentnych aktywności ujawnianych jedynie w specyficznych warunkach lub np. po ograniczonej proteolizie skutkiem działania swoistych proteaz, wówczas kiedy ujawnienie dodatkowej aktywności może mieć znaczenie biologiczne. Nośnikami takich latentnych aktywności są np. zymogeny układu krzepnięcia, dopełniacza, dobrze w tym zakresie poznane; większość z nich to białka mozaikowe.

Egzystujące różne moduły w białkach mozaiko-

wych, szczególnie ECM, ze względu na swe potencjalne funkcje, np. komórkowe, czynników wzrostowych, czy stymulacji justakrynej, być może są elementami wielopoziomowego systemu ukrytej informacji biologicznej mogącej mieć znaczenie w lokalnej samoregulacji tkankowej, przejawianej w formie określonej aktywności dopiero we właściwych ku temu warunkach, np. już niefizjologicznych.

#### V. Perspektywy

Liczba dotychczas poznanych sekwencji aminokwasowych różnych polipeptydów przewyższa kilkadziesiąt razy listę scharakteryzowanych struktur białkowych. Scharakteryzowanie wszystkich dużych białek o poznanej sekwencji aminokwasowej, w zakresie ich drugo- i trzeciorzędowej konformacji oraz funkcji biologicznej, wydawało się do niedawna wprost niemożliwe.

Przyszłościowa strategia badawcza, stawiająca sobie za cel poznanie własności strukturalno-funkcjonalnych dużych białek, opiera się na możliwości wykorzystania wyników badań nad pojedynczymi modułami do konstruowania struktury i modelowania funkcji całych natywnych makrocząsteczek [3, 12, 14, 18, 19, 26, 27]. Pozwala to przypuszczać, że wyjaśnienie konformacji przestrzennej dużych białek może nastąpić w niedalekiej przyszłości. Stało się to możliwe dzięki nowoczesnym technikom, mianowicie: reakcji łańcuchowej polimerazy, rekombinacji, klonowaniu i ekspresji białek, które mogą być z powodzeniem wykorzystywane do produkcji pojedynczych modułów białkowych. Preparaty określonych modułów polipeptydowych, rzędu 15 mg białka pozostającego w roztworze, są wystarczające do określenia pełnej trójwymiarowej struktury modułu rozpuszczonego w roztworze. Możliwość wykorzystania wysokiej rozdzielczości techniki jądrowego rezonansu magnetycznego (NMR) pozwala pominąć żmudne, często nieskuteczne procedury związane z krystalizacją polipeptydów [79]. NMR jest skuteczną techniką, która pozwala określić kształt polipeptydów zawierających do około 150 reszt aminokwasowych [80], większość modułów mieści się w tych granicach. Możliwość dodatkowego wykorzystania ukierunkowanej mutagenyzy wraz z oznaczeniem aktywności biologicznej wytworzonych produktów pozwala scharakteryzować plamki funkcjonalne poszczególnych modułów, tym samym pozwoli wyjaśnić szczegóły zależności między strukturą a funkcją poszczególnych modułów. Istnieją podstawy do przypuszczeń, że wyniki tego typu badań stworzą wiarygodną bazę danych, która będzie użyteczna podczas odtwarzania konformacji i modelowania funkcji wielu natywnych, dużych białek, szczególnie ECM, zawierających analizowane moduły.

*Aktykuł otrzymano 9 grudnia 1994 r.  
Zaakceptowano do druku 3 marca 1995 r.*

1. Doolittle RF (1985) *Trends Biochem Sci* **10**: 233-237
2. Patty L (1987) *FEBS Lett* **214**: 1-7
3. Baron M, Norman DG, Campbell IC (1991) *Trends Biochem Sci* **16**: 13-17
4. Gilbert WA (1985) *Science* **228**: 823-824
5. Doolittle RF (1989) *Trends Biochem Sci* **14**: 244-245
6. Doolittle RF, Feng DF, Johnson MS, McClure Ma (1986) *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol* **51**: 447-455
7. Sanders LC, Wang CS, Walling LL, Lord EM (1991) *Plant Cell* **3**: 629-635
8. Gilbert W (1978) *Nature (Lond)* **271**: 501-504
9. Dorit RL, Schoenbach L, Gilbert W (1990) *Science* **250**: 1377-1382
10. Benian GM, Kiff JE, Neckleman N, Moerman DG, Waterson RH (1989) *Nature (Lond)* **342**: 45-50
11. Bork P (1991) *FEBS Lett* **286**: 47-54
- 11a. Bork P, Doolittle RF (1992) *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 8990-8994
12. Campbell ID, Baron M (1991) *Philos Trans R Soc Lond Biol* **332**: 165-170
13. Richardson J (1981) *Adv Protein Chem* **34**: 167
14. Bork P, Grunwald C (1990) *Eur J Biochem* **191**: 347-358
15. Bork P, Rohde K (1990) *Biochem Biophys Res Commun* **171**: 1319-1325
16. Campbell ID, Baron M, Cooke RM, Dudgeon TJ, Fallon A, Harvey TS, Tappin MJ (1990) *Biochem Pharmacol* **40**: 35-40
17. Williams AF, Barclay AN (1988) *Annu Rev Immunol* **6**: 381-405
18. Barlow PN, Baron M, Norman DG, Day AJ, Willis AC, Sim RB, Campbell ID (1991) *Biochemistry* **30**: 997-10004
19. Baron M, Norman D, Willis AC, Campbell ID (1990) *Nature (Lond)* **345**: 642-646
20. Atkinson RA, Williams RJP (1990) *J Mol Biol* **204**: 191-204
21. Ruoslahti E (1988) *Annu Rev Biochem* **57**: 375-413
22. Yamada KM (1989) *Curr Opin Cell Biol* **1**: 956-963
23. Struhl K (1989) *Trends Biochem Sci* **14**: 137-140
24. Wright PE (1989) *Trends Biochem Sci* **14**: 255-260
25. Härd T, Kellenbach E, Boelans R, Maler BA, Dahlman K, Freedman LP, Carlstedt-Duke J, Yamamoto KR, Gustafsson JA, Kaptein R (1990) *Science* **249**: 157-160
26. Patty L (1991) *Curr Opin Struct Biol* **1**: 351-361
27. Barlow PN, Norman DG, Steinkasserer A, Horne TJ, Pearce J, Driscoll PC, Sim RB, Campbell ID (1992) *Biochemistry* **31**: 3626-3634
28. Sali A, Overington JP, Johnson MS, Blundell TL (1990) *Trends Biochem Sci* **15**: 235-240
29. Yamada KM (1991) *J Biol Chem* **266**: 12809-12812
30. Bevilacqua MP, Stengilin S, Gimborne MA, Seed B (1989) *Science* **243**: 1160-1165
31. Claesson-Walsh L, Eriksson A, Westermarck B, Heldin CH (1989) *Proc Natl Acad Sci USA* **86**: 4917-4921
32. Mallett S, Fossum S, Barclay AN (1990) *EMBO J* **9**: 1063-1068
33. Leonard WJ, Depper JH, Kaneshi M, Krönke M, Pfeiffer NJ, Svedlik PB, Sullivan M, Greene WC (1985) *Science* **230**: 633-639
34. Reid KMB, Day AJ (1989) *Immunol Today* **10**: 177-180
35. Müller-Eberhardt HJ (1988) *Annu Rev Biochem* **57**: 321-347
36. Goundis D, Reid KMB (1988) *Nature (Lond)* **335**: 82-84
37. Lawler J, Hynes RO (1986) *J Cell Biol* **103**: 1635-1648
38. Patty L (1985) *Cell* **41**: 657-663
39. Furie B, Furie BC (1988) *Cell* **53**: 505-518
40. McLean JW, Tomlinson JE, Kuang WJ, Eaton DL, Chen EY, Fless GM, Scanu AM, Lawn RM (1987) *Nature (Lond)* **330**: 132-137
41. Spring J, Beck K, Chiquet-Ehrismann R (1989) *Cell* **59**: 325-334
42. Stad R K, Buurman WA (1994) *Cell Adhesion Commun* **2**: 261-268
43. Hynes RO, Lander AD (1992) *Cell* **68**: 303-322
44. Hynes RO (1992) *Cell* **69**: 11-25
45. Noonan DM, Fulle A, Valente P, Cai S, Horigan E, Sasaki M, Yamada Y, Hassell JR (1991) *J Biol Chem* **266**: 22939-22947
46. Kallunki P, Tryggvason K (1992) *J Cell Biol* **116**: 559-571
47. Hayashi K, Madri JA, Yurchenco PD (1992) *J Cell Biol* **119**: 945-959
48. Massague J (1990) *J Biol Chem* **265**: 21393-21396
49. Carpenter G, Cohen S (1990) *J Biol Chem* **265**: 7709-7712
50. Scott J, Urdea M, Quiroga M, Sanchez-Pescador R, Fong N, Selby M, Rutter WJ, Bell GI (1989) *Science* **221**: 236-240
51. Handford PA, Baron M, Mayhew M, Willis A, Beesley T, Brownlee GG, Campbell ID (1990) *EMBO J* **9**: 475-480
52. Beck K, Hunter I, Engel J (1990) *FASEB J* **4**: 148-160
53. Engel J (1992) *Biochemistry* **31**: 10643-10651
54. Fox JW, Mayer U, Nischt R, Aumailley M, Reinhardt D, Wiedemann H, Mann K, Timpl R, Krieg T, Engel J, Chu ML (1991) *EMBO J* **10**: 3137-3146
55. Timpl R (1989) *Eur J Biochem* **180**: 487-502
56. Chu ML, Pan T, Conway D, Kuo HJ, Glanville RW, Timpl R, Mann K, Deutzmann R (1989) *EMBO J* **8**: 1839-1846
57. Chu ML, Zang RZ, Pan T, Stokes D, Conway D, Kuo HJ, Glanville RW, Mayer U, Mann K, Deutzmann R, Timpl R (1990) *EMBO J* **9**: 385-393
58. Vuorio E, De Crombrughe B (1990) *Annu Rev Biochem* **59**: 837-872
59. Bork P (1992) *FEBS Lett* **307**: 49-54
60. Cohen C, Parry DAD (1990) *Protein* **7**: 1-15
61. Conway JF, Parry DAD (1990) *Int J Biol Macromol* **12**: 328-334
62. Conway JF, Parry DAD (1991) *Int J Biol Macromol* **13**: 14-16
63. Engel J, Hunter I, Sculthess T, Beck K, Dixon TW, Parry DAD (1991) *Biochem Soc Trans* **19**: 839-844
64. Patty L (1991) *FEBS Lett* **289**: 99-101
65. Yurchenco PD, Schittny JC (1990) *FASEB J* **4**: 1577-1590
66. Kjellen L, Lindahl U (1991) *Annu Rev Biochem* **60**: 443-475
67. Mercurio AM (1990) *Curr Opin Cell Biol* **2**: 845-849
68. Mecham RP, Hinek A, Griffin GL, Senior RM, Liotta LA (1989) *J Biol Chem* **264**: 16652-16657
69. Zhou Q, Cummings D (1990) *Arch Biochem Biophys* **281**: 27-35
70. Shur BD (1989) *Biochem Biophys Acta* **988**: 389-409
71. Hinek A (1994) *Cell Adhesion Commun* **2**: 185-193
72. Roussele P, Lunstrum GP, Keene DR, Burgeson RE (1991) *J Cell Biol* **114**: 567-576
73. Jones JC, Green KJ (1991) *Curr Opin Cell Biol* **3**: 127-132
74. Dean JW, Chandrasekaran S, Tanzer ML (1990) *J Biol Chem* **265**: 12553-12562
75. Chandrasekaran S, Dean JW, Giniger MS, Tanzer ML (1991) *J Cell Biochem* **46**: 115-124
76. Mecham RP (1991) *FASEB J* **5**: 2538-2546
77. Erickson HP, Bourdon MA (1989) *Ann Rev Cell Biol* **5**: 71-92
78. Sharfi BG, LaFleur DW, Pirola CJ, Forrester JS, Fagin JA (1992) *J Biol Chem* **267**: 23910-23915
79. Campbell ID (1991) *Biochem Soc Trans* **19**: 243-248
80. Wright PE (1989) *Trends Biochem Sci* **14**: 255-260
81. Preissner KT, Koyama T, Muller D, Tschopp J, Muller-Berghaus G (1990) *J Biol Chem* **265**: 4915-4922

**Prenumerata „Postępów Biochemii” w 1995 r.**

**Prenumerata dla instytucji — 580 zł**

**Indywidualna — 280 zł**

**50% zniżki dla członków PTBioch.**



# Flipazy — białka transportujące fosfolipidy

## Flippases — phospholipid transporting proteins

ŁUKASZ PUŁASKI\*

### Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Asymetria transmembranowa
- III. Oznaczenie asymetrii i kinetyki dyfuzji transwersalnej fosfolipidów
- IV. Translokaza aminofosfolipidów
  - IV-1. Występowanie
  - IV-2. Specyficzność substratowa
  - IV-3. Kinetyka reakcji
  - IV-4. Próby charakteryzacji molekularnej
- V. Inne flipazy
- VI. Udział flipaz w powstawaniu i utrzymywaniu asymetrycznej dystrybucji fosfolipidów w błonach biologicznych
- VII. Rola fizjologiczna flipaz
- VIII. Podsumowanie

**Wykaz stosowanych skrótów:** PC — fosfatydylocholina; PE — fosfatydyloetanolamina; PS — fosfatydyloseryna; SM — sfingomielina; TNBS — kwas trinitriobenzoosulfonowy; NBD — reszta 4-nitrobenzo-2-oksa-1,3-diazolowa; EPR — elektronowy rezonans paramagnetyczny; ATP — adenosynotrifosforan; kDa — kilodalton; ER — siateczka śródplazmatyczna.

### I. Wstęp

Problem aktywnego transportu fosfolipidów w błonach biologicznych stanowi obecnie temat intensywnie badany i opracowywany. W ostatnich latach ukazało się kilka znakomitych artykułów przeglądowych, poświęconych w całości lub w części temu ciekawemu zjawisku [1-5]. W związku z tym celowe wydaje się przybliżenie tej problematyki polskiemu czytelnikowi.

Podstawowy zrąb strukturalny wszystkich znanych błon biologicznych stanowi dwuwarstwa fosfolipidowa. Badania wykazują, że dwuwarstwa ta stanowi nie tylko barierę nieprzepuszczalną dla związków hydrofilowych i strukturalną matrycę, w którą wbudowane są białka błonowe, ale znajdujący się w stanie dynamicznej równowagi system składników ważnych dla inicjacji i utrzymywania podstawowych funkcji komórki.

Wchodzące w skład dwuwarstwy lipidowej cząsteczki lipidów mają możliwość wykonywania trzech rodzajów ruchów: rotacji wokół własnej osi, dyfuzji poprzecznej w monowarstwie, w której się aktualnie

### Contents:

- I. Introduction
- II. Transmembrane asymmetry
- III. Determination of the transmembrane asymmetry and diffusion kinetics of phospholipids
- IV. Aminophospholipid translocase
  - IV-1. Distribution
  - IV-2. Substrate specificity
  - IV-3. Reaction kinetics
  - IV-4. Putative molecular characteristics
- V. Other flippases
- VI. Role of flippases in creating and maintaining asymmetric distribution of phospholipids in membranes
- VII. Physiological role of flippases
- VIII. Summary

znajdują, oraz dyfuzji transmembranowej, ruchu z jednej monowarstwy do przeciwległej (dyfuzja typu flip-flop).

### II. Asymetria transmembranowa

Na początku lat siedemdziesiątych naszego wieku poczyniono dwa niezwykle ważne odkrycia, kładące podwaliny pod zrozumienie zjawisk zachodzących w fosfolipidowej dwuwarstwie błon biologicznych. W 1971 roku Kornberg i McConnell stwierdzili, że w sztucznych pęcherzykach fosfolipidowych (liposomach) szybkość dyfuzji transmembranowej fosfolipidów jest niska, o czasie połówkowym rzędu godzin [6]. Jest to spowodowane silnie hydrofilowym charakterem główki cząsteczki fosfolipidu, zawierającej między innymi resztę fosforanową. Hydrofobowa, wewnętrzna strefa dwuwarstwy stanowi dla niej zatem dużą baterię energetyczną. Odkrycie to miało ogromne implikacje, dawało bowiem przesłanki teoretyczne dla opisu zjawiska powstawania i utrzymywania się w układach modelowych oraz w błonach naturalnych asymetrycznego rozmieszczenia fosfolipidów. W 1972 roku asymetria taka została stwierdzona eksperymentalnie w przypadku aminofosfolipidów błony erythrocytu [7]. Fakt istnienia nierównomiernej dystrybucji fosfolipidów w błonach biologicznych ma ważne konsekwencje fizjologiczne, a metodyka badania tego zjawiska jest stale rozwijana.

Erytrocyt ludzki jest komórką, dla której skład fosfolipidowy błony plazmatycznej jest doskonale poznany. Wartości uzyskane przez różne grupy badawcze

\* Mgr, Katedra Biofizyki Molekularnej UŁ, ul. St. Banacha 12/16, 90-237 Łódź

**Tabela 1.**

Rozmieszczenie głównych grup fosfolipidów w błonie plazmatycznej i błonach organelli wybranych komórek (opracowano na podstawie [4,5]).

Wartości w tabeli mówią, jaki odsetek danego fosfolipidu znajduje się w monowarstwie zewnętrznej (ekstracytoplazmatycznej dla błony plazmatycznej, cytoplazmatycznej dla błon organelli)

SM — sfingomielina; PC — fosfatydylocholina; PE — fosfatydyloetanoloamina; PS — fosfatydyloseryna; bd — brak danych

Rodzaj komórek lub organelli	SM	PC	PE	PS
Eryocyty człowieka	85	65-75	15-20	< 3
Eryocyty szczura	100	62	20	6
Eryocyty myszy	85	50	20	0
Eryocyty małpy	82	67	13	0
Płytki krwi człowieka	93	45	20	9
Płytki krwi świni	91	40	34	6
Fibroblasty LM myszy	bd	48	25-35	5
Fibroblasty embrionalne kury	bd	bd	34	17
Mioblasty embrionalne kury	bd	bd	66	46
Miocyty serca szczura	93	43	25	0
Rąbek rzęskowy nerki królika	80	34	23	15
Rąbek rzęskowy jelit królika	63	32	30	44
Rąbek rzęskowy jelit pstrąga	bd	bd	35-50	30
Hepatocyty szczura — błona kanalikularna	63	85	50	0
Hepatocyty szczura — błona ciągła	0	82	0	14
Hepatocyty szczura — błona sinusoidalna	66	85	55	0
Hepatocyty szczura — ER	60	70	40	10-20
Hepatocyty szczura — wewnętrzna błona mitochondrialna	bd	55	35-90	bd
Plemniki barana	90	60	15	15
Plemniki pstrąga	bd	bd	15-20	< 10
Drożdże	bd	bd	25-30	10-20
Siateczka sarkoplazmatyczna mięśni królika	25	48	69	15
Ziarnistości wydzielnicze nadnerczy wołu	20	65	67	50

różnią się między sobą w zależności od metodyki badań, jednak ogólny obraz wyłaniający się z tych danych jest następujący: ponad 85% cząsteczek sfingomieliny (SM) i około 70% cząsteczek fosfatydylocholiny (PC) znajduje się w monowarstwie zewnętrznej (ekstracytoplazmatycznej), natomiast w monowarst-

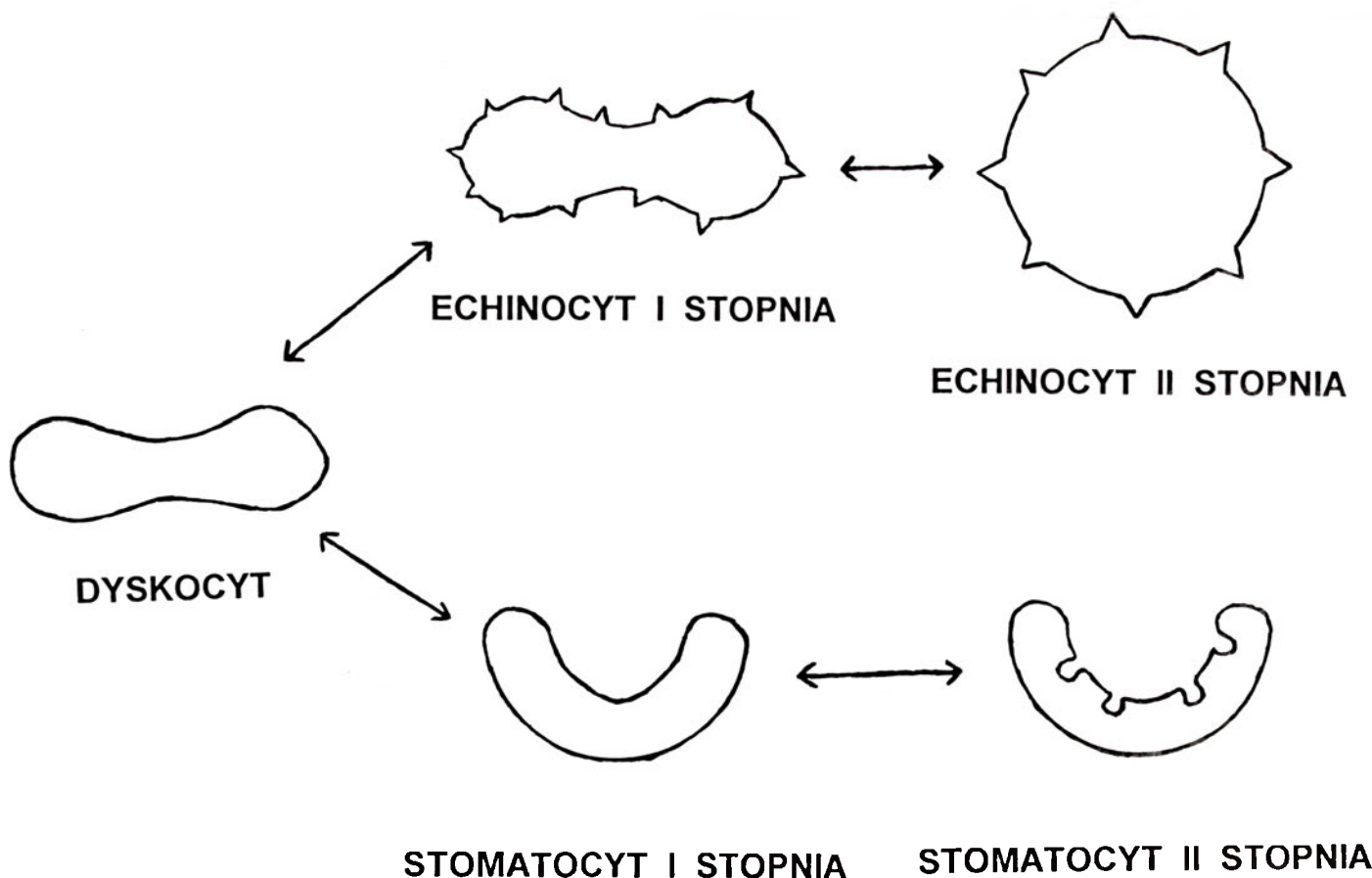
wie wewnętrznej zawartych jest około 85% cząsteczek fosfatydyloetanoloaminy (PE) oraz prawdopodobnie 100% fosfatydyloseryny (PS) [5]. Taki schemat podziału, w którym aminofosfolipidy (PS i PE) zlokalizowane są przede wszystkim w monowarstwie wewnętrznej, natomiast fosfolipidy cholinowe (PC i SM) w zewnętrznej, wydaje się przeważać w błonach plazmatycznych komórek eukariontów [4, 5, 8]. Nie wiadomo tylko, czy zaobserwowane różnice pomiędzy komórkami przypisać należy istniejącemu realnie zróżnicowaniu, czy jest to artefakt wynikający ze stosowania różnych metod izolowania błon i oceny asymetrycznego rozmieszczenia fosfolipidów. Na przykład, w błonie rąbka rzęskowego enterocyty królika stwierdzono aż 30% PS w monowarstwie zewnętrznej [9], ale błony te oczyszczone zostały z homogenatu komórkowego, a z badań na innym materiale wiadomo, że zachodzące podczas lizy komórki zaburzenia w błonie prowadzą do znaczącej redystrybucji fosfolipidów, sięgającej ponad dwudziestu procent [10].

### III. Metody określania asymetrii i kinetyki dyfuzji transwersalnej fosfolipidów

Metody badania asymetrii można sklasyfikować w dwie główne grupy: polegające na wyznaczaniu rozmieszczenia w błonie endogennych fosfolipidów oraz na śledzeniu rozmieszczenia sond lipidowych i kinetyki ich dyfuzji transmembranowej.

Metody pierwszej grupy opierają się bądź na selektywnej modyfikacji chemicznej fosfolipidów monowarstwy zewnętrznej, bądź na wykorzystywaniu specyficznych reakcji enzymatycznych. Jedną z najczęściej stosowanych metod selektywnej modyfikacji fosfolipidów zewnętrznej monowarstwy jest ich hydroliza przy zastosowaniu nie przenikających przez błonę fosfolipaz (najczęściej fosfolipazy A<sub>2</sub>) [11]. Po inkubacji z enzymem lipidy są ekstrahowane i rozdzielane chromatograficznie, a zawartość produktów hydrolizy w całkowitej frakcji lipidowej jest wyznacznikiem ekspozycji lipidu danej klasy na powierzchni błony. Stosując metody modyfikacji chemicznej należy upewnić się, że substancja znakująca nie przenika przez błonę oraz, że reakcja znakowania zachodzi o co najmniej rząd wielkości szybciej, niż spontaniczna dyfuzja transmembranowa lipidów. Przykładem takiej metody jest reakcja grupy -NH<sub>2</sub> aminofosfolipidów z kwasem trinitrobenzenosulfonowym (TNBS) [12, 13] lub fluoreskamina [14].

Bardziej rzetelne są metody opierające się na wykorzystaniu specyficznych reakcji enzymatycznych, zależnych od ekspozycji fosfolipidów pewnych klas na powierzchni błony, lub polegające na wiązaniu specyficznych białek rozpuszczalnych. Jako przykład mogą służyć metody wyznaczania odsetka eksponowanych na zewnątrz błony aminofosfolipidów: przez pomiar aktywności kompleksu protrombinazowego (tzw. mierzenie aktywności prokoagulacyjnej komórki) [15],



Ryc. 1. Zmiany kształtu erythrocytu pod wpływem zmian względnej powierzchni monowarstw.

badanie szybkości autofosforylacji kinazy białkowej C [16] oraz pomiar wiązania aneksyny V z błoną. Aneksyna V jest białkiem wiążącym się w obecności jonów wapniowych specyficznie i niekowalencyjnie z fosfatydyloseryną [17].

O ile metody pierwszej grupy są w stanie dostarczyć informacji jedynie o ustalonym już rozmieszczeniu fosfolipidów, o tyle metody wykorzystujące syntetyczne sondy lipidowe pozwalają na uzyskanie danych kinetycznych. Wprowadza się je do błony w ilościach śladowych, nie zaburzających struktury błony. Kinetyka ich redystrybucji w błonie i ostateczne rozmieszczenie śledzone są dzięki procedurom selektywnej ekstrakcji lub wygaszania np. fluorescencji cząsteczek w jednej tylko (najczęściej zewnętrznej) monowarstwie. Najpowszechniej stosowanymi rodzajami sond są fosfolipidy znakowane spinowo, poprzez przyłączenie do łańcucha kwasu tłuszczowego w pozycji  $\beta$  paramagnetycznej reszty doksylowej [18, 19], fosfolipidy znakowane fluorescencyjnie, poprzez przyłączenie reszty NBD (4-nitrobenzo-2-oks-1,3-diazolowej) [20,21] oraz znakowane izotopowo [22]. Metody wyznaczania transmembranowej dystrybucji wymienionych sond to między innymi ich ekstrakcja z monowarstwy wewnętrznej z użyciem odtłuszczonej albuminy surowicy wołu [19, 23, 24] lub lipidowych pęcherzyków akceptorowych [20, 39] oraz wygaszanie sygnału EPR sond paramagnetycznych w obecności askorbinianu [18] czy fluorescencji NBD-fosfolipidów w obecności czynników redukujących [25].

Do grupy tej zaliczyć można również metodę polegającą na śledzeniu zmian kształtu komórki. Stosuje się ją z powodzeniem erythrocytów, komórek o ściśle określonym kształcie, którego zmiany są łatwe do obserwowania. Metoda ta opiera się na zaproponowanej na początku lat siedemdziesiątych hipotezie *bilayer couple* [26]. W myśl tej hipotezy promień krzywizny dwuwarstwy lipidowej zależy od stosunku liczby cząsteczek lipidu w jednej i drugiej monowarstwie. Dwuwarstwa ulega wygięciu w kierunku monowarstwy, zawierającej mniej cząsteczek fosfolipidów, ze względu na jej mniejszą powierzchnię. Zatem po inkorporacji w błonę erythrocytu pewnej ilości egzogenego fosfolipidu, który ma tendencję do gromadzenia się w monowarstwie wewnętrznej, jej powierzchnia zwiększy się, w związku z czym cały erythrocyt przyjmie kształt jednowklęsły (stomatocytarny). I odwrotnie, fosfolipid gromadzący się w monowarstwie zewnętrznej, zwiększając jej powierzchnię, odprowadzi do tak zwanej krenacji, czyli transformacji echinocytarnej erythrocytu [27].

#### IV. Translokaza aminofosfolipidów

##### IV-1. Występowanie

Przełomowym wydarzeniem w badaniach nad asymetrycznym rozmieszczeniem fosfolipidów w błonach biologicznych było wykrycie w roku 1984 aktywnego

systemu transportującego aminofosfolipidy<sup>1</sup> z monowarstwy zewnętrznej do wewnętrznej [18]. Opisano wówczas zależną od ATP translokację aminofosfolipidów w erytrocytach ludzkich, wykrytą z wykorzystaniem sond spinowych. Zjawisko to zostało później potwierdzone przez wiele grup badawczych przy użyciu różnych metod. Stwierdzono, że aminofosfolipidy są przemieszczane z monowarstwy zewnętrznej do wewnętrznej bardzo szybko (czas połówkowy rzędu kilku minut), a proces ten uzależniony jest od dostępności ATP i jonów magnezowych po wewnętrznej stronie błony. Wykazano, że proces katalizowany jest przez enzym błonowy, translokazę aminofosfolipidów (*aminophospholipid translocase*) [28]. W sensie ogólniejszym mechanizm działania polegający na wiązaniu przez aktywne białko transportowe substratów w jednej z monowarstw i przenoszeniu ich do drugiej monowarstwy nazwano mechanizmem flipazowym, zaś białka działające na tej zasadzie — flipazami (*flippases*) [3]. Często terminem flipaza określa się po prostu translokazę aminofosfolipidów.

Flipaza błony erythrocytarnej zapełniła ważną lukę w obrazie aktywności ATPazowej błony erythrocytarnej. Badając ATPazy typu P w preparatach błony erythrocytarnej badacze stwierdzali zawsze obecność pewnej, dość znacznej aktywności podstawowej, pozostającej po zahamowaniu aktywności  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPazy i  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPazy [29]. Aktywność ta zależna była od jonów magnezowych, a hamowana przez jony wanadanowe i fluorkowe. Obecnie uważa się, że za tak zwaną aktywność  $\text{Mg}^{2+}$ -ATPazy w błonie erythrocytów odpowiada przede wszystkim właśnie translokaza aminofosfolipidów [2,5].

Aktywność translokazy aminofosfolipidów stwierdzono w błonach wielu rodzajów komórek, pochodzących z różnych organizmów eukariotycznych: w erythrocytach [18], płytkach krwi [30-32] i limfocytach [33] człowieka, erythrocytach wielu gatunków zwierząt (rezusa, wołu, konia, owcy, świni, psa i świnki morskiej) [21, 34], fibroblastach chomika [20], synaptosomach drętwy [1] i wreszcie w błonie ziarnistości chromochłonnych z komórek kory nadnerczy człowieka [35] — tam aktywność skierowana była odwrotnie, czyli aminofosfolipidy transportowane były z monowarstwy wewnętrznej (od strony światła ziarnistości) do zewnętrznej (cytoplazmatycznej).

#### IV-2. Specyficzność substratowa

Przeprowadzono badania nad specyficznością substratową translokazy aminofosfolipidów. Stwierdzono, że transportuje ona fosfolipidy o następujących cechach:

— polarna główka musi zawierać zdolną do dysoc-

jacji grupę aminową, oddzieloną od reszty fosforanowej przynajmniej dwiema grupami metylenowymi [19];

— grupa karboksylowa przy węglu  $\beta$  zasady azotowej (licząc od reszty fosforanowej) zwiększa powinowactwo do transportera, a zatem fosfatydyloseryna jest transportowana około dziesięciu razy szybciej niż fosfatydyloetanolamina [28, 27];

— grupa hydroksylowa przy węglu  $\beta$  glicerolu powinna być zestryfikowana; lizofosfatydyloseryna jest bardzo słabym substratem, ale już estryfikacja grupą acetylową przywraca większość aktywności transportowej, a fosfolipidowe sondy spinowe o łańcuchu w pozycji  $\beta$  długości pięciu węgli zachowują się podobnie jak lipidy naturalne [36, 19];

— nie jest ważny typ wiązania glicerol — reszta kwasu tłuszczowego w pozycji  $\alpha$ , jako że z równą szybkością transportowana jest diacylofosfatydyloseryna, jak i odpowiadający jej plazmalogen [5];

— z równą szybkością transportowane są fosfolipidy o nasyconych, jak i nienasyconych łańcuchach kwasów tłuszczowych [27];

— translokaza aminofosfolipidów transportuje jedynie stereoizomery L fosfolipidów względem węgla  $\beta$  glicerolu [20], wykazuje pewną preferencję względem naturalnego stereoizomeru seryny (L-fosfatydylo-L-seryny), aczkolwiek transportuje również L-fosfatydylo-D-serynę [37].

#### IV-3. Kinetyka reakcji

Podstawowa charakterystyka kinetyki reakcji przeprowadzanej przez translokazę aminofosfolipidów została przeprowadzona już w latach osiemdziesiątych. Jak już wspomniano, enzym ten czerpie energię z hydrolizy ATP, do której niezbędne są jony magnezowe.  $K_m$  transportu PS w całych erythrocytach wynosi  $5.4 \mu\text{M}$ , a w pęcherzykach otrzymanych z błony erythrocytarnej —  $4.7 \mu\text{M}$ . Odpowiednie wartości dla PE są o rząd wielkości większe, co wskazuje na niższe powinowactwo transportera do tego fosfolipidu ( $K_m$  odpowiednio  $50.4 \mu\text{M}$  i  $39.2 \mu\text{M}$ ) [28, 24]. Stechiometria transportu bliska jest jednej przetransportowanej cząsteczce lipidu na jedną zhydrolizowaną cząsteczkę ATP [24]. Aktywność translokazy aminofosfolipidów jest bardzo silnie hamowana przez jony wanadanowe ( $K_i \approx 5 \times 10^{-5} \text{ M}$ ) [18, 28, 38], hamują ją także jony fluorkowe [4, 5]. Bardzo silnym inhibitorem aktywności flipazowej są jony wapnia w cytozolu ( $K_i < 10^{-6} \text{ M}$ ) [38-40]. Natomiast jony wapniowe w przestrzeni zewnątrzkomórkowej nie mają wpływu na transport [38]. Aktywność translokazy aminofosfolipidów hamują również enzymy proteolityczne [41] oraz związki reagujące z grupami tiolowymi, takie jak N-etylomaleimid [27, 28, 33], pirydyloditioetyloamina [42] i bisdimetyloamid kwasu diazynodikarboksyłowego (diamid) [42, 22]. Aktywność flipazy spada wraz z wiekiem erythrocytów, co jest prawdopodobnie wynikiem bezpośredniego uszkodzenia cząsteczek enzymu przez

<sup>1</sup> lipidy zawierające pierwszorzędową grupę aminową w głowie polarnej: fosfatydyloseryna o sumarycznym ładunku ujemnym oraz fosfatydyloetanolamina

produkty peroksydacji lipidów [43].

#### IV-4. Próby charakteryzacji molekularnej białka

Podczas gdy eksperymenty kinetyczne nad translokacją aminofosfolipidów są przeprowadzane już od dość dawna z dobrym skutkiem, jej oczyszczanie i charakteryzowanie na poziomie molekularnym postępuje znacznie wolniej. Problemy pojawiły się już na pierwszym etapie — identyfikacji białka transportowego. Na podstawie eksperymentów ze znakowaniem białek radioaktywnymi fotoaktywowalnymi inhibitorami aktywności flipazowej Schroit i wsp. [42, 44] zaproponowali białko o masie 32 kDa jako podstawowy element systemu transportującego aminofosfolipidy. Białko to zidentyfikowane zostało jako determinant układu grupowego krwi Rh [45]. Ponieważ cząsteczka ta jest nieco za mała na samodzielny transporter aktywny i nie zawiera miejsc wiązania ATP, wymienieni autorzy zaproponowali model, w którym translokaza byłaby powiązana niekowalencyjnie z białkiem peryferycznym, zlokalizowanym na stronie cytoplazmatycznej błony, hydrolizującym ATP i dostarczającym energii do transportu [42, 2]. Natomiast Devaux i wsp. [46, 47], na podstawie eksperymentów z fotoaktywowalnymi fosfolipidami i izotopowo znakowanymi analogami ATP, wybrali jako najlepszego kandydata na translokazę aminofosfolipidów białko o masie około 120 kDa. Częściowo oczyszczony preparat białek błon erytrocytarnych, wzbogacony w tę frakcję, wykazywał aktywność ATPazową zależną od jonów magnezowych, hamowaną przez jony wanadanowe, fluorkowe i wapniowe oraz stymulowaną przez dodatek egzogennych aminofosfolipidów [47-49]. Co więcej, ATPazę o podobnej masie i właściwościach zidentyfikowano w błonach ziarnistości wydzielniczych komórek nadnerczy, gdzie znaleziono również aktywność flipazową [35]. Koncepcja wskazująca na białko 120 kDa jako główny składnik systemu transportowego jest bardzo prawdopodobna, jednocześnie nie wykluczając koncepcji białka 32 kDa. Oba wymienione białka mogą wchodzić równocześnie w skład złożonego kompleksu, odpowiadającego łącznie za obserwowaną aktywność translokazy aminofosfolipidów [2, 5].

#### V. Inne flipazy

Translokaza aminofosfolipidów jest najlepiej scharakteryzowanym białkiem z grupy flipaz, jednak z pewnością nie jedynym. Ponad wszelką wątpliwość udowodniona została obecność w błonie siateczki śródplazmatycznej (ER) białka katalizującego ułatwioną dyfuzję cząsteczek fosfolipidów w płaszczyźnie poprzecznej dwuwarstwy. Transporter ten po raz pierwszy wykryty został w błonie siateczki śródplazmatycznej z wątroby szczura [50]. Stwierdzono wówczas szybkie wyrównywanie stężeń w obu monowarstwach krótko-

łańcuchowego analogu fosfatydylocholino, przy czym transport ten charakteryzował się kinetyką nasyceniową i ulegał zahamowaniu w wyniku trawienia proteazami. Z początku sugerowano, że transport ten jest specyficzny dla PC [50], jednak późniejsze eksperymenty dowiodły, że specyficzność transportera jest bardzo niska i wszystkie badane typy fosfolipidów były przezeń transportowane z jednakową szybkością [43]. Jednocześnie, w błonie ER nie stwierdzono odpowiednika translokazy aminofosfolipidów. Do podobnych wniosków prowadzą wyniki eksperymentów rekonstytucyjnych białka transportującego [51]. Aktywność tego białka nie jest spolaryzowana, transportuje ono lipidy w obie strony, zatem zaproponowano dla niego nazwę „flip-flopaza” dla podkreślenia tego faktu [4].

Innym przedstawicielem grupy flipaz mogłoby być białko odpowiedzialne za gwałtowne zniesienie asymetrii lipidów błonowych w niektórych komórkach (*lipid scrambling*). Najlepiej zbadane pod tym względem są płytki krwi. Płytki krwi w wyniku aktywacji zmieniają kształt i zaczynają gwałtownie uwalniać hormony i substancje modulujące (serotonina, adrenalina, nukleotydy adeninowe) [52]. Pod wpływem niektórych czynników, wywołujących aktywację płytek, następuje bardzo szybka reorientacja niektórych lipidów, zwłaszcza fosfatydyloseryny, która nagle pojawiając się w monowarstwie zewnętrznej błony nadaje jej własności prokoagulacyjne [53, 54]. Aktywacji płytek towarzyszy zwykle zwiększenie wewnątrzkomórkowego poziomu jonów wapniowych. Postuluje się istnienie zależnego od jonów  $Ca^{2+}$  białka, powodującego po aktywacji szybką redystrybucję fosfolipidów niezależnie od klasy, zarówno transport aminofosfolipidów do monowarstwy zewnętrznej, jak i sfingomieliny do wewnętrznej [32, 55]. W zależności od rodzaju bodźca aktywującego odpowiedź komórki przedstawia się różnie. Czynniki słabo aktywujące płytki doprowadzają jedynie do niewielkiego wzrostu stężenia wewnątrzkomórkowego  $Ca^{2+}$ , wystarczającego do stymulacji białka odpowiedzialnego za zniesienie asymetrii, jednak bez hamowania aktywności translokazy aminofosfolipidów. W tych warunkach jest ona nawet stymulowana przez nadmiar substratu w monowarstwie zewnętrznej [31]. Substancje łatwo wywołujące reakcję uwalniania, takie jak mieszanina kolagenu i trombiny lub jonofor wapniowy, poza stymulacją redystrybucji lipidów i zahamowaniem translokazy aminofosfolipidów doprowadzają do fuzji ziarnistości wydzielniczych z błoną plazmatyczną. Podczas związanego z tym rozszczepiania i zlewania błon lub pęcherzyków endocytarnych w miejscach egzo- i endocytozy powstają prawdopodobnie przejściowe struktury lipidowe inne niż dwuwarstwa, co prowadzi do dalszego wymieszania się składników błony [4, 5]. Podobną, wyzwalaną przez zwiększenie wewnątrzkomórkowego stężenia  $Ca^{2+}$ , szybką redystrybucję lipidów stwierdzono w erytrocytach, choć jest ona tam mniej intensywna niż w płytkach krwi [56, 40].

W najnowszych pracach sugeruje się, że proces ten może jednak nie być zależny od konkretnego białka błonowego, a jedynie od proporcji stężeń w monowarstwach błony fosfatydylo-(4,5-bifosfo)-inozytolu [37, 57].

Flipazami są również produkty genu *mdr2* gryzoni i jego ludzkiego odpowiednika *MDR3*, które w kanalikularnej błonie hepatocytów wątroby katalizują eksport fosfolipidów (głównie fosfatydylocholino) do żółci [58, 58a].

Od dawna sugerowano, że oprócz białek specyficznie transportujących fosfolipidy z jednej dwuwarstwy do drugiej, integralne białka błonowe mogłyby ułatwiać transwersalną dyfuzję cząsteczek lipidów [59, 3]. Wydaje się, że glikoforyna czy białko pasma 3 w błonie erytrocytarnej mogą przyspieszać szybkość reorientacji fosfolipidów, być może wytwarzając na styku z błoną przejściowe struktury niedwuwarstwowe lub zaburzając otoczkę hydratacyjną główek fosfolipidów [5, 60, 61].

Wysunięto ciekawą hipotezę, w myśl której odpowiedzialne za zjawisko oporności wielolekowej białka z grupy białek zawierających domenę wiążącą ATP (białka ABC, *ATP-Binding Cassette proteins*), takie jak produkt ludzkiego genu *MDR1*, glikoproteina P eksportująca aktywnie kationowe ksenobiotyki [61a], miałyby działać zgodnie z mechanizmem flipazowym, pobierając swoje substraty z wewnętrznej monowarstwy [62]. Zasadność takiej sugestii wysuwanej także w odniesieniu do innych transporterów błonowych, należałoby dopiero udowodnić.

## VI. Udział flipaz w powstawaniu i utrzymaniu asymetrycznej dystrybucji fosfolipidów w błonach biologicznych

Powstawanie i utrzymanie się asymetrii składu fosfolipidowego w błonie biologicznej uzależnione jest od współdziałania kilku czynników, wpływających na zmianę orientacji lipidów w błonie. Swoje udziały mogą mieć tutaj:

- asymetryczna synteza lipidów;
- transport pomiędzy różnymi błonami katalizowany przez białka transportujące;
- potencjał błonowy i asymetryczny rozkład ładunku w białkach błonowych, wpływające na określoną orientację naładowanych cząsteczek fosfolipidów;
- specyficzne oddziaływanie białek cytoszkieletu i innych białek peryferycznych z fosfolipidami konkretnej klasy;
- spontaniczny flip-flop;
- dyfuzja ułatwiona, katalizowana przez specyficzne transportery lub niespecyficznymi przez pewne integralne białka błonowe;
- aktywny transport poprzez translokazę aminofosfolipidów.

W konkretnej błonie decydujący wpływ na asymetryczne rozmieszczenie fosfolipidów może mieć jeden czy dwa z powyższych czynników. Ustalenie hierarchii ich ważności jest trudne. W przypadku błony eryt-

rocytu bardzo długo panowała koncepcja, w myśl której za preferencyjną lokalizację cząsteczek aminofosfolipidów w monowarstwie cytoplazmatycznej odpowiedzialne są głównie niekowalencyjne oddziaływania aminofosfolipidów z cytoszkieletem erytrocytu, a zwłaszcza ze spektryną i ankiryną [63, 64]. Wykazano jednak, że takie oddziaływania, nawet gdyby istniały *in vivo*, nie mogłyby odpowiadać za asymetrię fosfolipidów, jaką obserwujemy w błonie erytrocytarnej [65-67]. Co więcej, asymetria nie ulegała zaburzeniu w układach doświadczalnych nie zawierających elementów cytoszkieletu, a jedynie aktywną translokazę aminofosfolipidów [68, 69]. Okazało się zatem, że to aktywność translokazy aminofosfolipidów jest podstawowym czynnikiem wytwarzającym i utrzymującym obserwowaną w tym systemie asymetrię składu fosfolipidowego. Możliwe jest jednak, że w innych słabiej zbadanych systemach biologicznych, o utrzymaniu asymetrii błonowej decydują inne czynniki.

## VII. Rola fizjologiczna flipaz

Wykazano, że translokaza aminofosfolipidów niezbędna jest do wytworzenia i zachowania asymetrii składu lipidowego błony biologicznej. Jej rolę fizjologiczną należy rozpatrywać w powiązaniu z rolą, jaką pełnią substraty enzymu — aminofosfolipidy. Obecnie postuluje się kilka funkcji biologicznych tych lipidów w wewnętrznej i zewnętrznej monowarstwie błony. Jak wiadomo, kinaza białkowa C, zaangażowana w fosforylację wielu białek komórkowych (od białek cytoszkieletu do histonów) i co za tym idzie modulację ich funkcji, jest ściśle zależna od fosfatydyloseryny [70]. A zatem w wyniku działania translokazy aminofosfolipidów, regulującej dostępność aminofosfolipidów w różnych przedziałach komórki, pośrednio może odbywać się regulacja wielu procesów metabolicznych. Specyficzność substratowa kinazy białkowej zależy od stężenia fosfatydyloseryny w błonie, z którą enzym jest związany. Przy niskich i średnich stężeniach PS największy udział w całkowitej aktywności kinazowej ma autofosforylacja, działanie na inne substraty wymaga dostępności dużej ilości PS [71].

Inną wyróżnioną przez badaczy grupą białek są aneksyny, białka wiążące się z błonami w obecności jonów wapniowych [71a]. Jedną z postulowanych funkcji aneksyn jest fuzja błon biologicznych, na przykład przy zlewaniu się różnych ziarnistości wewnątrzkomórkowych z błoną plazmatyczną [72]. I w tym procesie mogłyby odgrywać rolę flipaza, poprzez regulację dostępności aminofosfolipidów dla aneksyn wpływając pośrednio na fuzję. Aminofosfolipidy w błonie działają jako czynnik fuzogenny nie tylko dzięki obecności aneksyn. Dzięki redukcji w obecności jonów wapniowych otoczki hydratacyjnej błony ułatwiają zbliżanie się i fuzję różnych błon [73]. Dzięki lokalnemu wytwarzaniu destabilizujących dwuwarstwę struktur heksagonalnych  $H_{II}$  (zwłaszcza

PE) również mogą ułatwiać fuzję [5, 74].

Translokaza aminofosfolipidów może też grać ważną rolę w zjawiskach endocytozy. Prawdopodobnie pierwszym etapem powstawania wpuklenia endocytocznego jest stymulacja aktywności flipazy, która przenosi większą niż zwykle liczbę cząsteczek fosfatydyloseryny i fosfatydyloetanoloaminy z monowarstwy zewnętrznej do wewnętrznej, powodując zgodnie z koncepcją *bilayer couple* wygięcie błony do wnętrza komórki. Oczywiście endocytoza jest wynikiem współdziałania wielu składników komórki, ale fakty takie jak wpuklenie błony w erytrocytach po spowodowaniu redystrybucji lipidów czynnikami nie hamującymi translokazy aminofosfolipidów [75] oraz wytwarzanie pęcherzyków pseudoendocytocnych przez erytrocyty sztucznie wzbogacone w ATP [76] przemawiają za ważką funkcją flipazy w tym procesie.

Inne prawdopodobne funkcje biologiczne translokazy aminofosfolipidów związane są z ekspozycją fosfatydyloseryny na powierzchni krwinek. W warunkach normalnych w monowarstwie zewnętrznej błony plazmatycznej krążących w krwiobiegu erytrocytów ilość fosfatydyloseryny bliska jest zeru. Ilość ta może wzrastać, na przykład w komórkach starzejących się, gdzie aktywność flipazowa spada [43]. Makrofagi i komórki śródbłonna rozpoznają komórki zawierające na powierzchni cząsteczki fosfatydyloseryny i usuwają je z krwiobiegu [77, 78], zatem translokaza aminofosfolipidów może być jednym z kluczowych elementów systemu biorącego udział w eliminacji krwinek patologicznych (np. erytrocytów sierpowatych), starzejących się i apoptocytocnych.

Flip-flopaza z siateczki śródplazmatycznej powoduje niespecyficzną redystrybucję nowo syntetyzowanych fosfolipidów w błonie cystern, nie dopuszczając do ich akumulacji w monowarstwie wewnętrznej, co prowadziłoby do zakłóceń kształtu i funkcji błony [4]. Natomiast hipotetyczne białko powodujące wyzwalaną przez jony wapniowe redystrybucję fosfolipidów błony płytek krwi mogłoby odgrywać kluczową rolę w systemie odpowiedzi płytki na bodźce aktywujące. Prawdopodobnie wydaje się, że obserwowane po silnej aktywacji płytki uwalnianie pęcherzyków egzocytocnych spowodowane jest gwałtownym przemieszczeniem części aminofosfolipidów z monowarstwy wewnętrznej do zewnętrznej. Prowadzić to może do silnego zaburzenia kształtu błony oraz powstawania miejscowych uwypukleń i odrywania się pęcherzyków. Układ translokazy aminofosfolipidów — białko szybkiej redystrybucji działać może na podobnej zasadzie, jak zespół aktywnych pomp jonowych i wyzwanych potencjałem kanałów jonowych w błonie neuronu. Translokaza aminofosfolipidów wytwarza w błonie gradient stężeń fosfatydyloseryny i fosfatydyloetanoloaminy, który może następnie w odpowiedzi na pobudzenie zostać momentalnie zlikwidowany [4, 5]. Jak wiadomo, fosfatydyloseryna jest niezbędnym ogniwem w kaskadzie hemostatycznej, wchodząc w skład kom-

pleksu protrombinazy, zawierającego ponadto czynnik  $X_a$ ,  $V_a$  i jony wapniowe [15].

## VIII. Podsumowanie

Flipazy to grupa białek odpowiedzialnych za wewnątrzblonowy (transmembranowy) transport cząsteczek fosfolipidów. Najlepiej spośród nich poznana jest translokaza aminofosfolipidów, enzym aktywnie transportujący cząsteczki aminofosfolipidów z zewnętrznej monowarstwy błony plazmatycznej do monowarstwy wewnętrznej. Białka te pełnią zapewne ważne role fizjologiczne w regulacji kształtu komórek, zjawisk endo- i egzocytoczy oraz regulacji enzymów zależnych od niektórych klas fosfolipidów.

Artykuł otrzymano 8 listopada 1994 r.  
Zaakceptowano do druku 27 lutego 1995 r.

## Piśmiennictwo

1. Zachowski A, Devaux PF (1990) *Experientia* **46**: 644-656
2. Schroit AJ, Zwaal RFA (1991) *Biochim Biophys Acta* **1071**: 313-329
3. Devaux PF (1991) *Biochemistry* **30**: 11663-1173
4. Devaux PF (1992) *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **21**: 417-439
5. Zachowski A (1993) *Biochem J* **294**: 1-14
6. Kornberg RD, McConnell HM (1971) *Biochemistry* **10**: 1111-1120
7. Bretscher MS (1972) *Nature New Biol* **236**: 11-12
8. Op den Kamp JAF (1978) *Ann Rev Biochem* **48**: 47-71
9. Lipka G, Op den Kamp JAF, Hauser H (1991) *Biochemistry* **30**: 11828-11836
10. Schrier SL, Zachowski A, Hervé P, Kader J-C, Devaux PF (1992) *Biochim Biophys Acta* **1105**: 170-176
11. Verkleij AJ, Zwaal RFA, Roelofsen B, Comfurius P, Kastelijn D, van Deenen LLM (1973) *Biochim Biophys Acta* **323**: 178-193
12. Schick PK, Kurica KB, Chacko GK (1976) *J Clin Invest* **57**: 1221-1226
13. Etemadi A-H (1980) *Biochim Biophys Acta* **604**: 423-475
14. Rawlyer A, Roelofsen B, Op den Kamp JAF (1984) *Biochim Biophys Acta* **769**: 330-336
15. Zwaal RFA, Comfurius P, van Deenen LLM (1977) *Nature (Lond)* **268**: 358-360
16. Daleke DL, Huestis WH, Newton AC (1994) *Anal Biochem* **217**: 33-40
17. Dachary-Prigent J, Freyssinet J-M, Pasquet J-M, Carron J-C, Nurden AT (1993) *Blood* **81**: 2554-2565
18. Seigneuret M, Devaux PF (1984) *Proc Natl Acad Sci USA* **71**: 4457-4461
19. Morrot G, Hervé P, Zachowski A, Fellmann P, Devaux PF (1989) *Biochemistry* **28**: 3456-3462
20. Martin OC, Pagano RE (1987) *J Biol Chem* **262**: 5890-5898
21. Connor J, Schroit AJ (1989) *Biochemistry* **28**: 9680-9685
22. Middelkoop E, Coppens A, Llanillo M, van der Hoek EE, Slotboom AJ, Lubin BH, Op den Kamp JAF, van Deenen LLM, Roelofsen B (1989) *Biochim Biophys Acta* **978**: 241-248
23. Dressler V, Haest CWM, Plasa G, Deuticke B, Erusalimsky JD (1984) *Biochim Biophys Acta* **775**: 189-196
24. Beleznyay Z, Zachowski A, Devaux PF, Puente Navazo M, Ott P (1993) *Biochemistry* **32**: 3146-3152
25. McIntyre JC, Sleight RG (1991) *Biochemistry* **30**: 11819-11827

26. Sheetz MP, Singer SJ (1974) *Proc Natl Acad Sci USA* **81**: 3751-3755
27. Daleke DL, Huestis WH (1985) *Biochemistry* **24**: 5406-5416
28. Zachowski A, Favre E, Cribier S, Hervé P, Devaux PF (1986) *Biochemistry* **25**: 2585-2590
29. Drickamer LK (1975) *J Biol Chem* **250**: 1952-1954
30. Sune A, Bette-Bobillo P, Bienvenue A, Fellmann P, Devaux PF (1987) *Biochemistry* **26**: 2972-2978
31. Tilly RHJ, Senden JMG, Comfurius P, Bevers EM, Zwaal RFA (1990) *Biochim Biophys Acta* **1029**: 188-190
32. Comfurius P, Senden JMG, Tilly RHJ, Schroit AJ, Bevers EM, Zwaal RFA (1990) *Biochim Biophys Acta* **1026**: 153-160
33. Zachowski A, Herrmann A, Paraf A, Devaux PF (1987) *Biochim Biophys Acta* **897**: 197-200
34. Sune A, Vidal M, Morin P, Sainte-Marie J, Bienvenue A (1988) *Biochim Biophys Acta* **946**: 315-327
35. Zachowski A, Henry J-P, Devaux PF (1989) *Nature (Lond)* **340**: 75-76
36. Tilley L, Cribier S, Roelofsen B, Op den Kamp JAF, van Deenen LLM (1986) *FEBS Lett* **194**: 21-27
37. Smeets EF, Comfurius P, Bevers EM, Zwaal RFA (1994) *Biochim Biophys Acta* **1195**: 281-286
38. Bitbol M, Fellmann P, Zachowski A, Devaux PF (1987) *Biochim Biophys Acta* **904**: 268-282
39. Connor J, Gillum K, Schroit AJ (1990) *Biochim Biophys Acta* **1025**: 82-86
40. Henseleit U, Plasa G, Haest C (1990) *Biochim Biophys Acta* **1029**: 127-135
41. Bevers EM, Tilly RHJ, Senden JMG, Comfurius P, Zwaal RFA (1989) *Biochemistry* **28**: 2382-2387
42. Connor J, Schroit AJ (1988) *Biochemistry* **27**: 848-851
43. Herrmann A, Devaux PF (1990) *Biochim Biophys Acta* **1027**: 41-46
44. Connor J, Schroit AJ (1987) *Biochemistry* **26**: 5099-5105
45. Schroit AJ, Bloy C, Connor J, Cartron JP (1990) *Biochemistry* **29**: 10303-10306
46. Zachowski A, Fellmann P, Hervé P, Devaux PF (1987) *FEBS Lett* **223**: 315-320
47. Morrot G, Zachowski A, Devaux PF (1990) *FEBS Lett* **266**: 29-32
48. Daleke DL, Cornely-Moss KA, Smith CM (1991) *Biophys J* **59**: 381a
49. Zimmerman ML, Daleke DL (1993) *Biochemistry* **32**: 12257-12263
50. Bishop WR, Bell RM (1986) *Cell* **42**: 51-60
51. Backer JM, Dawidowicz EA (1987) *Nature (Lond)* **327**: 341-343
52. Seiss W (1989) *Physiol Rev* **69**: 58-178
53. Bevers EM, Comfurius P, Zwaal RFA (1983) *Biochim Biophys Acta* **736**: 57-66
54. Zwaal RFA, Bevers EM, Comfurius P, Rosing J, Tilly RHJ, Verhallen PFJ (1989) *Mol Cell Biochem* **91**: 23-31
55. Williamson P, Kulick A, Zachowski A, Schlegel RA, Devaux PF (1992) *Biochemistry* **31**: 6355-6360
56. Chandra R, Joshi PC, Bajpai VK, Gupta CM (1987) *Biochim Biophys Acta* **902**: 253-262
57. Sulpice J-C, Zachowski A, Devaux PF, Giraud F (1994) *J Biol Chem* **269**: 6347-6354
58. Smit JJM, Schinkel AH, Oude Elferink LPJ, Groen AK, Wagenaar E, van Deemter L, Mol CAAM, Ottenhoff R, van der Lunt NMT, van Roon MA, van der Valk MA, Offerhaus GJA, Berns AJM, Borst P (1993) *Cell* **75**: 451-462
- 58a. Ruetz S, Gros P (1994) *Cell* **77**: 1071-1081
59. de Kruijff B, van Zoelen EJJ, van Deenen LLM (1987) *Biochim Biophys Acta* **509**: 537-542
60. Vondenhof A, Oslender A, Deuticke B, Haest CWM (1994) *Biochemistry* **33**: 4517-4520
61. Connor J, Pak CH, Zwaal RFA, Schroit AJ (1992) *J Biol Chem* **267**: 19412-19417
- 61a. Gottesman MM, Pastan I (1993) *Annu Rev Biochem* **62**: 385-427
62. Higgins CF, Gottesman MM (1992) *Trends Biochem Sci* **17**: 18-21
63. Haest CWM, Plasa G, Kamp D, Deuticke B (1978) *Biochim Biophys Acta* **509**: 21-32
64. Williamson P, Antia R, Schlegel RA (1987) *FEBS Lett* **219**: 316-320
65. Calvez J-Y, Zachowski A, Herrmann A, Morrot G, Devaux PF (1988) *Biochemistry* **27**: 5666-5670
66. Gudi SRP, Kumar A, Bhakuni V, Ghodale SM, Gupta CM (1990) *Biochim Biophys Acta* **1023**: 63-72
67. Herrmann A, Müller P (1986) *Bioscience Reports* **6**: 185-191
68. Kuypers FA, Lubin BH, Yee M, Agre P, Devaux PF, Geldwerth D (1993) *Blood* **81**: 1051-1057
69. de Jong K, Ott P (1993) *FEBS Lett* **334**: 183-188
70. Hannun YA, Loomis CR, Bell RM (1986) *J Biol Chem* **261**: 7184-7190
71. Newton AC, Koshland DE (1990) *Biochemistry* **29**: 6656-6661
- 71a. Raynal P, Pollard HB (1994) *Biochim Biophys Acta* **1197**: 63-93
72. Crumpton MJ, Dedman JR (1990) *Nature (Lond)* **345**: 212
73. Papahadjopoulos D, Vail WJ, Pangborn WA, Poste G (1976) *Biochim Biophys Acta* **448**: 265-283
74. Ellens H, Siegel DP, Alford D, Yeagle PL, Boni L, Lis LJ, Quinn PJ, Bentz J (1989) *Biochemistry* **28**: 3692-3703
75. Schrier SL, Zachowski A, Devaux PF (1992) *Blood* **79**: 782-786
76. Penniston JT (1972) *Arch Biochem Biophys* **153**: 410-412
77. Tanaka Y, Schroit AJ (1993) *J Biol Chem* **258**: 11335-11343
78. Fadok VA, Voelker DR, Campbell PA, Cohen JJ, Bratton DL, Henson PM (1992) *J Immunol* **148**: 2207-2216

Wydawca prosi o kontakt tych, którzy chcieliby wykorzystać łamy „Postępy 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.



# Glikoaminoglikany — struktura i funkcja

## Glycosaminoglycans — structure and function

ANDRZEJ GŁOWACKI<sup>1</sup>  
EWA MARIA KOŹMA<sup>2</sup>  
KRYSZYNA OLCZYK<sup>3</sup>  
EUGENIUSZ J. KUCHARZ<sup>4</sup>

### Spis treści:

- I. Wprowadzenie
- II. Rodzaje glikoaminoglikanów
  - II-1. Glikoaminoglikany heparanowe
  - II-2. Glikoaminoglikany keratanowe
  - II-3. Glikoaminoglikany chondroityno-dermatanowe
  - II-4. Kwas hialuronowy

**Wykaz stosowanych skrótów:** GAG — glikoaminoglikan(y); HS — siarczan(y) heparanu; HSPG — proteoglikany heparanosiarczanowe; KS — siarczan(y) keratanu; KS-I — rogówkowy siarczan keratanu; KS-II — szkieletowy siarczan keratanu; Ch-4-S — chondroityno-4-siarczan(y); Ch-6-S — chondroityno-6-siarczan(y); Ch — chondroityna; DS — siarczan(y) dermatanu; HA — kwas hialuronowy, hialuronian; PG — proteoglikany.

### I. Wprowadzenie

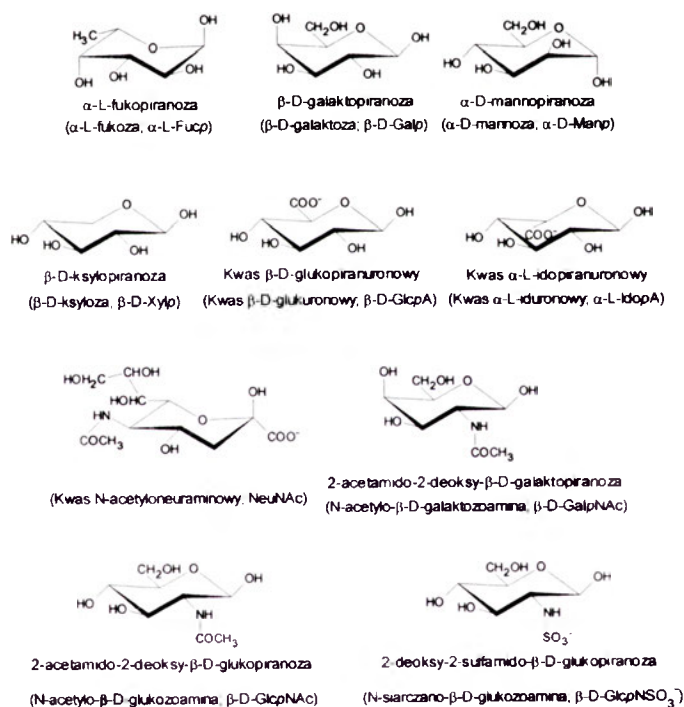
Termin „glikoaminoglikany” wprowadził w 1960 roku Jeanloz [1], w miejsce — nadanego w 1934 roku przez Meyer a, — określenia „kwaśne mukopolisacharydy” [cyt. wg 2].

Glikoaminoglikany (GAG) są to liniowe, nierozgałęzione heteropolisacharydy pochodzenia zwierzęcego, zbudowane z powtarzających się, disacharydowych sekwencji [3, 4]. Podjednostki te składają się z reszt N-acetylowanej heksozoaminy (D-glukozyaminy lub D-galaktozoaminy) albo N-siarczanowanej D-glukozyaminy oraz reszt kwasu heksuronowego (D-glukuronowego lub L-iduronowego) albo galaktozy [4, 5]. W niektórych glikoaminoglikanach wykazano także obecność reszt L-fukozy, D-mannozy, D-ksylozy i kwasu N-acetyloneuraminowego (Ryc. 1) [2, 6].

Obecność w disacharydowych podjednostkach, budujących szkielet polisacharydowy GAG, znacznej liczby reszt siarczanowych i/lub karboksylowych, na-

### Contents:

- I. Introduction
- II. Species of glycosaminoglycans
  - II-1. Heparan glycosaminoglycans
  - II-2. Keratan glycosaminoglycans
  - II-3. Chondroitin-dermatan glycosaminoglycans
  - II-4. Hyaluronic acid



**Ryc. 1.** Struktura chemiczna monosacharydów występujących w łańcuchach glikoaminoglikanów. W nawiasach podano nazwy zwyczajowe tych monosacharydów oraz powszechnie przyjęte skróty nazw owych związków.

daje łańcuchom glikoaminoglikanów charakter polianionów, o dużej gęstości ujemnego ładunku elektrycznego [3, 7].

Biorąc pod uwagę chemiczną budowę łańcuchów glikanowych, Scott [8] wyróżnił cztery następujące grupy GAG:

1. glikoaminoglikany heparanowe,
2. glikoaminoglikany keratanowe,
3. glikoaminoglikany chondroityno-dermatanowe,

<sup>1</sup>Dr, <sup>2</sup>mgr, <sup>3</sup>prof. dr hab., Katedra i Zakład Chemii Klinicznej i Diagnostyki Laboratoryjnej, Śląska Akademia Medyczna, ul. Jagiellońska 4, 41-200 Sosnowiec

<sup>4</sup>prof. dr hab., IV Katedra i Klinika Chorób Wewnętrznych, Śląska Akademia Medyczna, ul. Edukacji 102, 43-100 Tychy

#### 4. kwas hialuronowy.

Glikoaminoglikany z trzech pierwszych grup wchodzi w skład glikoprotein zwanych proteoglikanami (PG) [8, 9]. Częsteczki te, produkowane prawdopodobnie przez wszystkie komórki zwierzęce [9], zbudowane są z białkowego rdzenia, z którym związany jest jeden lub więcej łańcuchów GAG, jednego lub różnych typów [10]. Część białkowa PG, zsyntetyzowana na rybosomach, w siateczce śródplazmatycznej zostaje zaopatrzona w N-glikozydowo łączone łańcuchy oligosacharydowe [3, 4, 11, 12]. Potem, już w aparacie Golgiego, następuje synteza O-glikozydowo łączonych oligosacharydów oraz łańcuchów GAG [9, 12, 13]. Synteza tych ostatnich rozpoczyna się od rozpoznania odpowiednich reszt aminokwasowych białka rdzeniowego i przeniesienia na nie, przez określone glikozylotransferazy, reszt cukrowych tzw. regionu łączącego [9, 12]. Struktury tego regionu pokazane są na rycinie 2, 3b i 4b. Następnie, do końca nieredukującego ostatniej reszty cukrowej wspomnianego regionu zostają naprzemiennie przyłączone reszty odpowiedniej heksozoaminy i kwasu glukuronowego (lub galaktozy), co daje w rezultacie łańcuch glikoaminoglikanowy [3, 9, 12-15]. Powstały łańcuch podlega dalej modyfikacjom, będącym przyczyną znacznej heterogenności w obrębie każdego typu GAG i obejmującym epimeryzację niektórych reszt kwasu glukuronowego do kwasu iduronowego oraz siarczanowanie reszt cukrowych [12-16]. W łańcuchach heparyny i siarczanu heparanu te modyfikacje poprzedza N-deacetylacja i N-siarczanowanie niektórych reszt glukozyaminy [9, 14, 15].

Zsyntetyzowane proteoglikany są albo w różny sposób wiązane z błoną komórkową, albo też podlegają sekrecji do przestrzeni pozakomórkowej [17, 18]. W miejscach swego przeznaczenia omawiane makrocząsteczki mogą oddziaływać z wieloma typami cząsteczek, biorąc udział m.in. w zjawiskach adhezji, wzrostu i różnicowania komórek, fibrogenyzy kolagenu czy mineralizacji kości [4, 10, 19-21]. Interakcje te wymagają najczęściej równoczesnego uczestnictwa części cukrowej i białkowej cząsteczki proteoglikanu [9, 17, 19]. Tym niemniej, istnieją funkcje PG wypełniane wyłącznie przez ich łańcuchy GAG [3, 4, 9, 22].

Funkcje tego typu, stanowiące przedmiot niniejszego artykułu, mogą być także podejmowane przez wolne łańcuchy glikanowe, powstające w wyniku rozpadu proteoglikanów w przestrzeni pozakomórkowej [4].

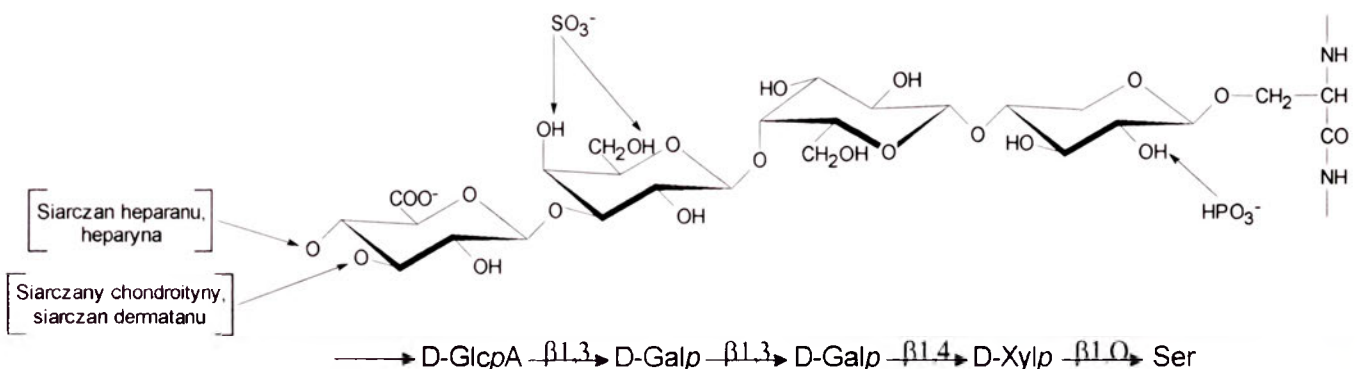
Grupa czwarta — wg klasyfikacji *Scotta* — obejmuje wyłącznie kwas hialuronowy. Glikoaminoglikan ten, w odróżnieniu od innych GAG, jest syntetyzowany w błonie komórkowej poprzez naprzemiennie przyłączanie reszt N-acetyloglukozaminy i kwasu glukuronowego [3, 12, 23]. Powstały hialuronian nie podlega modyfikacjom ani nie tworzy połączeń kowalencyjnych z białkami [24, 25]. Tym niemniej, w przestrzeni zewnątrzkomórkowej oddziałuje on niekowalencyjnie z wieloma różnymi cząsteczkami [24-27].

## II. Rodzaje glikoaminoglikanów

### II-1. Glikoaminoglikany heparanowe

Grupa ta obejmuje siarczany heparanu (HS) i heparynę (Hep). Heparynę, jako substancję hamującą krzepnięcie krwi, wyizolował w roku 1916 *McLean* [cyt. wg 2, 28]. Dwa lata później, *Howell* i *Holt* nadali owej substancji obowiązującą do dzisiaj nazwę. Siarczan heparanu został zaś wyizolowany i nazwany przez *Jorpesa* i *Gardella* w 1948 roku [cyt. wg 2, 28].

Siarczany heparanu, o masach cząsteczkowych od 14 do 100 kDa [29], są produkowane prawdopodobnie przez wszystkie typy komórek zwierzęcych [9]. Glikany te wchodzi w skład proteoglikanów heparanosiarczanowych, łącząc się z resztą serylową białka rdzeniowego poprzez tetrasacharydowy region łączący, przedstawiony na rycinie 2. Siarczany heparanu, w postaci HSPG, występują w przestrzeni wewnątrz- i zewnątrzkomórkowej [4, 9, 20, 30-34]. W przypadku lokalizacji komórkowej znajduje się je w ziarnistościach wydzielniczych [4] i na powierzchni błon komórkowych [20, 31, 33, 35], a siarczany heparanu, będące produktami degradacji HSPG, także w jądrze komórkowym [4, 7, 32]. W przestrzeni zewnątrzkomórkowej siarczany heparanu wchodzi w skład HSPG substancji podstawowej tkanki łącznej — w tym — błon podstawnych [4, 9, 34, 36, 37]. Omawiane związki



Ryc. 2. Sekwencja tetrasacharydowa, łącząca glikoaminoglikany heparanosiarczanowe i chondroityno-dermatanowe z resztą serylową białka rdzeniowego. Strzałkami zaznaczono miejsca w resztach cukrowych mogące ulegać siarczanowaniu lub fosforylacji.

występują powszechnie w tkankach, przy czym szczególnie wysoką ich zawartość stwierdza się w płucach, wątrobie, nerkach, tkance nerwowej i ścianie naczyń krwionośnych [7, 9, 37, 38].

Heparyny są syntetyzowane i magazynowane w komórkach tucznych i bazofilach, jako proteoglikany o dużej masie cząsteczkowej (do 1000 kDa) [4, 9, 15, 28]. Glikany heparynowe przyłączone są do rdzenia białkowego za pośrednictwem tetrasacharydu, identycznego jak w HSPG [4, 9, 39, 40]. Po otrzymaniu przez wymienione wyżej komórki sygnału do sekrecji heparyn, ich proteoglikany ulegają enzymatycznej degradacji. W rezultacie, następuje wydzielanie aktywnych heparyn w postaci glikanów o masach cząsteczkowych w zakresie od 5 do 40 kDa [4, 28, 41].

Stosunkowo duże ilości heparyn stwierdza się w płucach i błonie śluzowej jelit, mniejsze w ścianie naczyń krwionośnych, wątrobie i nerce [2, 7, 28, 35, 42]. Degradacja zaś tych glikoaminoglikanów odbywa się w wątrobie, śledzionie, leukocytach i makrofagach [7, 28]. Heparyny i produkty ich rozpadu wydalone są z moczem [2, 28, 43].

Łańcuchy glikoaminoglikanów heparanowych zawierają — w różnych proporcjach — reszty kwasu  $\beta$ -D-glukuronowego i  $\alpha$ -L-iduronowego oraz reszty N-acetylowanej i N-siarczanowanej  $\alpha$ -D-glukoaminy. Glikany te mają wyłącznie wiązania glikozydowe typu 1 $\rightarrow$ 4 pomiędzy resztami cukrowymi [8, 44].

Disacharydowe sekwencje wchodzące w skład glikanów heparanowych przedstawiono na rycinie 5 a-f [2, 9, 45].

Wspólną cechą omawianych glikoaminoglikanów jest charakterystyczna, domenowa budowa łańcucha cukrowego [9, 22]. Obok ubogosiarczanowanych fragmentów tego łańcucha, zbudowanych z reszt N-acetyloglukozoaminy i kwasu glukuronowego, istnieją domeny z dużą zawartością reszt O-siarczanowanej N-siarczanoglukozoaminy oraz O-siarczanowanego kwasu iduronowego [14, 17, 46]. W siarczanach heparanu dominuje kwas glukuronowy, zaś reszty glukozoaminy są N-siarczanowane i N-acetylowane w zmiennych proporcjach. Według Gallaghera i w s p. [29], pierwsza reszta N-siarczanoglukozoaminy występuje po 8-12 disacharydowej, niesiarczanowanej domenie HS. Na 1 mol disacharydowych sekwencji siarczanów heparanu przypada od 0.4 do 2 mola grup siarczanowych [7, 28].

W cząsteczkach heparyn przeważają domeny zbudowane z reszt N-siarczanoglukozoaminy i kwasu iduronowego. W obrębie tych domen większość reszt N-siarczanoglukozoaminy jest dodatkowo O-siarczanowana przy szóstym atomie węgla, a większość reszt iduronianowych występuje w postaci pochodnych 2-O-siarczanowanych. Heparyny zawierają od 1.5 do 3 moli grup siarczanowych na mol disacharydowych podjednostek, 2.5 krotnie więcej reszt kwasu iduronowego niż glukuronowego oraz około 80% reszt glukozoaminy — w postaci N-siarczanowych pochodnych

[7, 9, 28]. Wysoka zawartość grup siarczanowych sprawia, że heparyny mają charakter najsilniejszego naturalnego polianionu [3, 39, 47]. Z tego też powodu mogą one oddziaływać z wieloma różnymi cząsteczkami. Mimo jednak dużego wachlarza oddziaływań, w których mogą uczestniczyć heparyny, ich fizjologiczna rola jest mocno ograniczona [48].

Przykłady oddziaływań heparyn i siarczanów heparanu z różnymi cząsteczkami przedstawiono w tabeli 1. Oddziaływania te charakteryzują się wysokim powinowactwem, choć w większości są nieswoiste [4, 9, 20, 28, 49, 50]. Prawdopodobnie tylko w przypadku oddziaływań heparyn (a także siarczanów heparanu) z antytrombiną III i zasadowym czynnikiem wzrostowym fibroblastów wymagana jest obecność swoistych sekwencji szkieletu cukrowego (Ryc. 4a i 4b) [4, 9, 48].

## II-2. Glikoaminoglikany keratanowe

Siarczan keratanu (keratosiarczan) po raz pierwszy wyizolowali w 1953 roku Meyer i w s p., najpierw z rogówki wołowej, a następnie z ludzkiej chrząstki [cyt. wg 2].

Glikoaminoglikany keratanowe występują w organizmach zwierzęcych w postaci proteoglikanów. W cząsteczkach tych łańcuchy siarczanów keratanu połączone są z białkami rdzeniowymi za pośrednictwem oligosacharydowych regionów, zawierających reszty mannozy, fukozy, galaktozaminy i kwasu N-acetylneuraminowego [2, 51-57]. Wyróżnia się dwa zasadnicze typy omawianych połączeń, co stanowi podstawę do podziału glikanów keratanowych na dwa rodzaje:

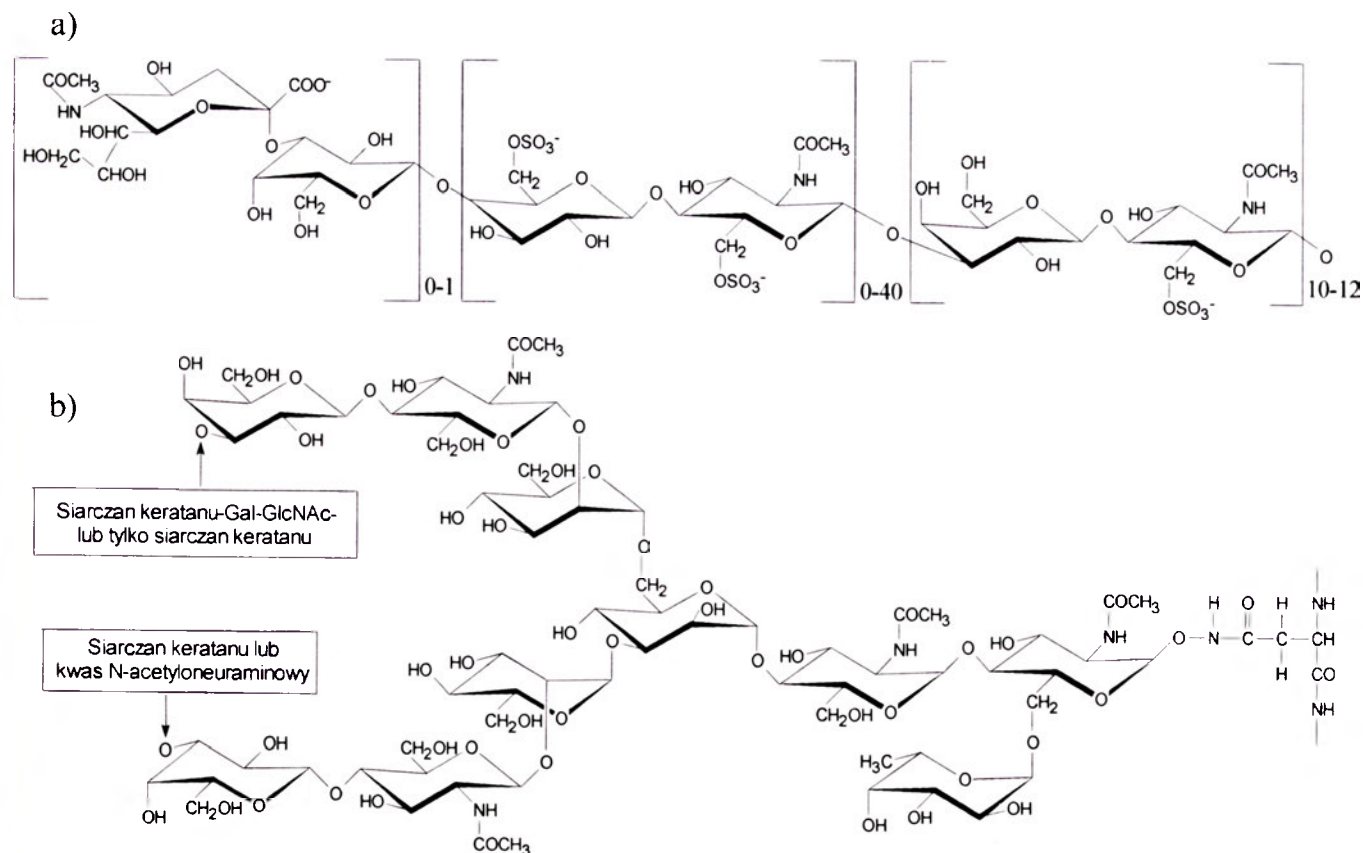
1. rogówkowy siarczan keratanu (KS-I), o strukturze przedstawionej na rycinie 3a. Jest on N-glikozydowo związany z resztą asparaginy białka rdzeniowego, za pomocą oligosacharydu, zawierającego m.in. reszty mannozy (Ryc. 3b). Poza rogówką, obecność KS-I stwierdzono w wielu tkankach, jakkolwiek w ilościach 20-1000 razy mniejszych [52-56].
2. szkieletowy siarczan keratanu (KS-II), którego strukturę zaprezentowano na rycinie 4a. Glikany tego typu są O-glikozydowo związane z resztą seryny lub treoniny białka rdzeniowego, oligosacharydem o masie cząsteczkowej około 1 kDa, który przedstawiono na rycinie 4b. Łańcuchy KS-II zakończone są często tetrasacharydem o masie cząsteczkowej około 1 kDa (Ryc. 4c). Szkieletowy siarczan keratanu w dużych ilościach występuje w chrząstce (stanowi tam 5-20% wszystkich GAG) i krążkach międzykręgowych (stanowi w nich 30-40% wszystkich GAG), zaś w mniejszej ilości — w kościach i tkance nerwowej [6, 51, 52, 54-60].

Nietypowe dla innych glikoaminoglikanów sposoby wiązania KS z białkiem rdzeniowym oraz brak w cząsteczkach reszt kwasu heksuronowego powodu-

**Tabela 1.** Działanie biologiczne wykazywane przez glikoaminoglikany

Typ glikoaminoglikanów	Funkcje biologiczne glikoaminoglikanów	Piśmiennictwo
Siarczany heparanu	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Działają antykoagulacyjnie, za pośrednictwem pentasacharydowej domeny swoiście wiążącej antytrombinę III (Ryc. 6a).</li> <li>2. Działają antyproliferacyjnie; działanie to wykazuje frakcja jądrowa omawianego glikanu, charakteryzująca się dużą zawartością 2-O-siarczanowanych reszt kwasu glukuronowego.</li> <li>3. Aktywują zasadowy czynnik wzrostowy fibroblastów (bFGF) za pośrednictwem 14-sacharydowej sekwencji (Oligo-H), przedstawionej na ryc. 6b.</li> <li>4. Stymulują lipazę lipoproteinową, podobnie — choć słabiej — jak heparyna.</li> </ol>	<p>9,48</p> <p>20,30-32,48,81</p> <p>46,82-84</p> <p>4,7,33</p>
Heparyny	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Wpływają na procesy różnicowania i proliferacji komórek, poprzez: <ul style="list-style-type: none"> <li>— oddziaływania z czynnikami wzrostowymi oraz cytokinami (interferonem <math>\gamma</math>, czynnikami wzrostowymi fibroblastów, czynnikiem wzrostowym komórek Schwanna, czynnikiem płytkowym, czynnikiem wzrostowym komórek śródbłonna, interleukiną 3, interleukiną 7) i ich ochronę przed degradacją oraz umożliwienie reakcji z receptorami,</li> <li>— oddziaływania z czynnikami transkrypcyjnymi — dimerem Fos/Jun,</li> <li>— zwiększenie okresu półtrwania m-RNA.</li> </ul> </li> <li>2. Wpływają na procesy adhezji i migracji komórek, poprzez oddziaływania z glikoproteinami substancji podstawowej macierzy zewnątrzkomórkowej.</li> <li>3. Wpływają na enzymy, wykazując działanie: <ul style="list-style-type: none"> <li>— hamujące na ATP-azę, <math>\beta</math>-amylazę, <math>\beta</math>-glukuronidazę, cyklazę adenylową, dehydrogenazę alkoholową i bursztynianową, elastazę, fosfatazę kwasną i zasadową, heparanazę, hialuronidazę, oksydazę lizylową, katalazę, katepsynę B, proteazę obojętną i pepsynę,</li> <li>— aktywujące na kolagenazę, esterazy, polimerazę DNA, hydroksylazę tyrozyny,</li> <li>— pobudzające sekrecję prokolagenazy, <math>\beta</math>-glicerofosfatazy, kwaśnej rybonukleazy.</li> </ul> </li> <li>4. Wpływają na hemostazę, poprzez: <ul style="list-style-type: none"> <li>— aktywację inhibitorów proteinaz serynowych — serpin: antytrombiny III (Ryc. 6a), heparynowego kofaktora II, inhibitora białka C, neksyny-1,</li> <li>— uwalnianie i aktywację tkankowych aktywatorów plazminogenu,</li> <li>— hamowanie niektórych czynników kaskady krzepnięcia np. czynnika VIIIa, IXa czy Xa,</li> <li>— hamowanie retrakcji skrzepu.</li> </ul> </li> <li>5. Wpływają na układ immunologiczny, poprzez: <ul style="list-style-type: none"> <li>— aktywację makrofagów i komórek naturalnie cytotoksycznych, zwiększanie liczby eozynofiliów i limfocytów,</li> <li>— regulację aktywności dopełniacza (prawdopodobnie przez wiązanie witronektyny),</li> <li>— hamowanie tworzenia kompleksów antygen-przeciwciała, unieczynnianie anafilatoksyn,</li> <li>— działania przeciwwzapalne i immunosupresyjne,</li> <li>— blokowanie inwazyjności wirusów HSV i HIV (wypieranie ich z powierzchniowych receptorów komórkowych zawierających HSPG).</li> </ul> </li> <li>6. Wpływają na metabolizm lipoprotein, poprzez: <ul style="list-style-type: none"> <li>— uwalnianie lipazy lipoproteinowej i lipazy wątrobowej z połączeń z HSPG a następnie aktywację tych enzymów.</li> <li>— uwalnianie lipoprotein o niskiej gęstości z ich receptorów komórkowych,</li> <li>— hamowanie absorpcji lipoprotein o niskiej gęstości przez makrofagi.</li> </ul> </li> <li>7. Wpływają na układ hormonalny, poprzez: <ul style="list-style-type: none"> <li>— hamowanie syntezy aldosteronu i somatotropiny, uwalnianie tyroksyny i insuliny, wzmaganie działania parathormonu, obniżanie aktywności ACTH, kortyzolu i wazopresyny.</li> </ul> </li> <li>8. Wpływają na metabolizm ksenobiotyków i związków endogennych, poprzez: <ul style="list-style-type: none"> <li>— unieczynnianie leków (kurary, glikozydów naparstnicy, neomycyny, streptomycyny) i innych związków biologicznie czynnych (bradykininy, histaminy, jadu żmiji, toksyn bakteryjnych).</li> </ul> </li> </ol>	<p>4,21,68,85</p> <p>4</p> <p>4,86</p> <p>4,30,87</p> <p>4,7,28,68</p> <p>9,28,68,88</p> <p>28,38</p> <p>4,28,48</p> <p>4,48</p> <p>48</p> <p>7,28</p> <p>89</p> <p>89,90</p> <p>28,38</p> <p>89,90</p> <p>4,38,90</p> <p>4,91</p> <p>4,42</p> <p>4,42</p> <p>7,28</p> <p>28</p>
Siarczany chondroityny	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Kompleksują lipoproteiny o małej i bardzo małej gęstości.</li> <li>2. Przyspieszają powstawanie fibryny i wzmacnianie wiązania pomiędzy fibrylami włókna.</li> <li>3. Stymulują produkcję glikoaminoglikanów i hamowanie syntezy kolagenu w chondrocytach i komórkach nabłonkowych rogówki.</li> <li>4. Stymulują wytwarzanie połączeń jonowo-metabolicznych pomiędzy hepatocytami w hodowlach komórkowych.</li> <li>5. Redukują aktywność kwaśnych hydrolaz poprzez kompleksowanie ich cząsteczek.</li> <li>6. Żelifikują <i>in vitro</i> roztwory kolagenowe (pomiędzy makrocząsteczkami polisacharydowymi i polipeptydowymi zachodzą wzajemne elektrostatyczne oddziaływania).</li> </ol>	<p>7,43,92</p> <p>43</p> <p>4,7</p> <p>4</p> <p>3,7</p> <p>2,8</p>

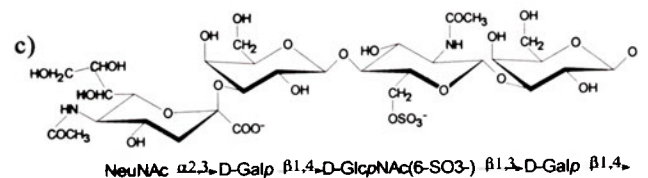
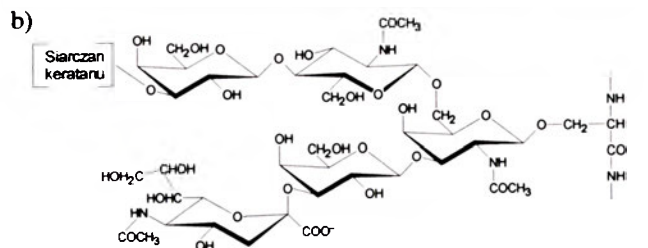
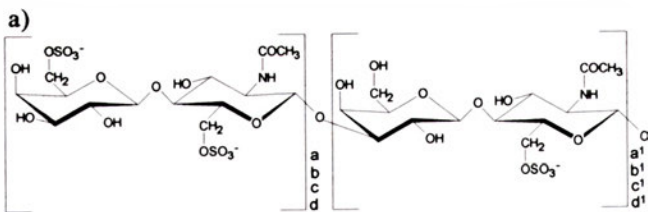
Siarczany dermatanu	<p>Prócz funkcji biologicznych wspólnych z siarczanami chondroityny, wykazują ponadto:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Właściwości antykoagulacyjne, aktywując poprzez specyficzną, heksasacharydową domenę (Ryc. 7), należący do serpin, heparynowy kofaktor II.</li> <li>2. Zdolność wiązania czynnika płytkowy 4 (PF 4).</li> <li>3. Zdolność aktywacji lipazy lipoproteinowej.</li> </ol>	<p>9,48 4,92 43,48</p>
Kwas hialuronowy	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Bierze udział w utrzymaniu równowagi wodno-elektrolitowej. Wiązanie wody w polisacharydowej sieci, której obok proteoglikanów istotną częścią jest HA, powoduje wysoką oporność tkankową na przepływ wody. Ponieważ wspomniana sieć węglowodanowa wiąże także niskocząsteczkowe jony, spełnia więc ona funkcje buforu osmotycznego.</li> <li>2. Tworzy agregaty z niektórymi proteoglikanami (zwłaszcza z PG chrząstki — agrekanami).</li> <li>3. Bierze udział w procesach koagulacji (HA wiąże się z fibrynogenem, przyspiesza tworzenie fibryny i wzmacnia powstały włóknik, wiąże czynnik płytkowy 4).</li> <li>4. Bierze udział w regulacji transportu białek osoczowych w tkankach. Wspomniana w pkt. 1 sieć węglowodanowa wykazuje efekt sferycznego wykluczania dla różnych cząsteczek w zależności od ich rozmiarów. Właściwość ta ma też znaczenie przy ochronie tkanek przed penetracją bakterii, grzybów i wirusów.</li> <li>5. Pełni funkcję biologicznego smaru dla stawów (maż stawowa) i powierzchni trących w narządach (lepki i elastyczny roztwór HA występuje np. na powierzchniach bocznych włókien mięśniowych).</li> <li>6. Bierze udział w procesach rozpoznania, proliferacji i lokomocji komórek (poprzez swoistą dla hialuronianu grupę receptorów nazwanych CD44).</li> <li>7. Pełni funkcję czynnika przeciwzapalnego (poprzez oddziaływania z leukocytami).</li> <li>8. Bierze prawdopodobnie udział w formowaniu tkanek oraz przestrzennej orientacji komórek i białek włóknistych.</li> <li>9. Hamuje aktywność enzymów lizosomalnych.</li> </ol>	<p>24-26,37 4,6,55,57,59,60 24,93,94 24,25,37 24,25,37,38 24,95-97 24,94,98 24,37 24,37</p>



Ryc. 3. Struktury rogówkowego siarczanu keratanu:

a) polisacharydowe łańcuchy glikozoaminoglikanu,

b) oligosacharydowa sekwencja łącząca rogówkowe KS z resztą asparaginylową białka rdzeniowego.



Ryc. 4. Struktury szkieletowego siarczanu keratanu:

- a) formy siarczanu keratanu chrząstki nosowej wołu, różniące się stopniem polimeryzacji sekwencji disacharydowych. Poniżej podano liczby disacharydowych podjednostek w łańcuchu cukrowym: a = 1 i a' = 6 lub b = 4 i b' = 2, lub c = 5 i c' = 3, lub d = 7 i d' = 1,
- b) oligosacharydowa sekwencja łącząca szkieletowe KS z resztą serylową lub treonylową białka rdzeniowego,
- c) tetrasacharydowa sekwencja końcowa, obecna w niektórych łańcuchach szkieletowego KS.

je, że siarczan keratanu zaliczany bywa do laktozoaminoglikanów (LAG) [54]. Glikoaminoglikany keratanowe zbudowane są z reszt N-acetyloglukozoaminy i D-galaktozy, połączonych wiązaniami glikozydowymi, naprzemiennie 1→3 i 1→4 [3, 8, 44]. Wymienione reszty cukrowe w polisacharydowych łańcuchach siarczanu keratanu (KS) tworzą disacharydowe sekwencje, co zilustrowano na rycinie 5g [2, 44, 61]. Zawartość grup siarczanowych w przeliczeniu na 1 mol disacharydowej podjednostki KS wynosi od 0.8 do 1.8 mola [38]. Masy cząsteczkowe glikanów keratanowych stanowią od 2 do 30 kDa [51-53].

Fizjologiczna rola tych glikoaminoglikanów wynika z postaci w jakiej występują *in vivo*, czyli ich uczestnictwa w strukturach różnych proteoglikanów [6, 53-55, 58-60, 62, 63]. Natomiast, w przebiegu niektórych chorób, przejawiających się wzmożoną degradacją chrząstki, obserwuje się wzrost stężenia glikanów keratanowych w surowicy krwi, które to zjawisko wykorzystuje się w diagnostyce tych schorzeń [6, 57-59, 64, 65].

## II-3. Glikoaminoglikany chondroityno-dermatanowe

Grupa ta obejmuje trzy typy glikanów: chondroityno-4-siarczan (Ch-4-S; siarczan chondroityny A), chondroityno-6-siarczan (Ch-6-S; siarczan chondroityny C) oraz siarczan dermatanu (DS; siarczan chondroityny B) [2, 8].

Siarczan chondroityny został odkryty w 1884 roku przez K r u k e n b e r g a [cyt. wg 2], natomiast D a v i d s o n i M e y e r [66] po raz pierwszy wyizolowali z chrząstki wołowej chondroitynę (ubogosiarczanowany chondroitynosiarczan). Ci sami badacze ustalili też struktury chemiczne Ch-4-S i Ch-6-S. Z kolei, w 1956 roku N a k a n i s h i i w s p. [cyt. wg 2] wyizolowali z chrząstki rekina chondroitynosiarczan D (bogatosiarczanowany Ch-6-S). Siarczan dermatanu jako pierwszy otrzymali ze skóry wieprzowej M e y e r i C h a f f e e w 1941 roku [cyt. wg 2]. Budowę wymienionego GAG znamy dzięki badaniom J e a n l o z a i S t o f f y n a oraz F r a n s s o n a [cyt. wg 2].

Glikoaminoglikany chondroitynowe i dermatanowe tworzą proteoglikany, w obrębie których łańcuchy glikanowe łączą się z resztami serylowymi białek rdzeniowych za pomocą tetrasacharydowej sekwencji łączącej, o strukturze przedstawionej na rycinie 2. Wspomniane PG, często niosąc dodatkowo łańcuchy siarczanu heparanu (np. betaglikan [67] lub niektóre syndekany [68]) czy siarczanu keratanu (np. agrekany [69]) — są szeroko rozpowszechnione w organizmach zwierzęcych [6, 20, 55]. Występują głównie w przestrzeni pozakomórkowej a proteoglikany chondroitynowe także wewnątrz i na powierzchni komórek [4, 6, 9, 30, 42]. Do tkanek szczególnie zasobnych w te glikoaminoglikany należą: chrząstka i krążek międzykręgowy oraz kość, ścięgno, skóra, pępowina, ściana naczyń krwionośnych, zastawka serca [6, 13, 20, 42, 55, 59, 63, 67, 70-73].

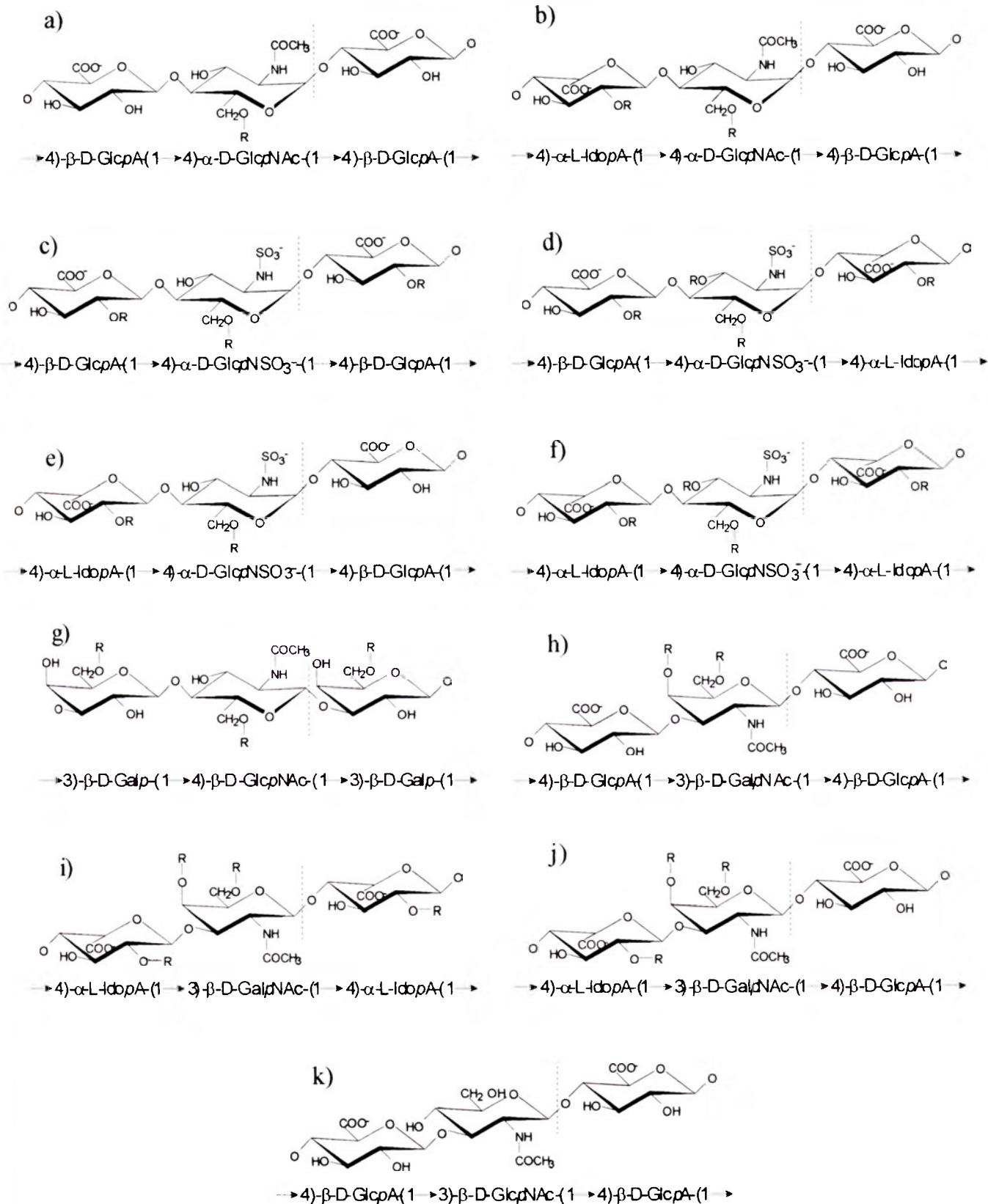
Obecność wolnych glikanów chondroitynowych i dermatanowych o różnej zawartości reszt siarczanowych stwierdzono natomiast w surowicy krwi i w moczu. Częsteczki te są produktami degradacji proteoglikanów [2, 74].

Glikoaminoglikany chondroitynosiarczanowe składają się z naprzemiennie ułożonych reszt N-acetylogalaktozoaminy i kwasu D-glukuronowego, tworzących disacharydową strukturę, którą przedstawiono na rycinie 5h [2, 4, 6, 45]. Glikany te zawierają grupy siarczanowe związane z resztami heksozoaminy. Charakterystyczne położenie reszty siarczanowej w pierścieniu piranozowym N-acetylogalaktozoaminy jest podstawą klasyfikacji siarczanów chondroityny na [2]:

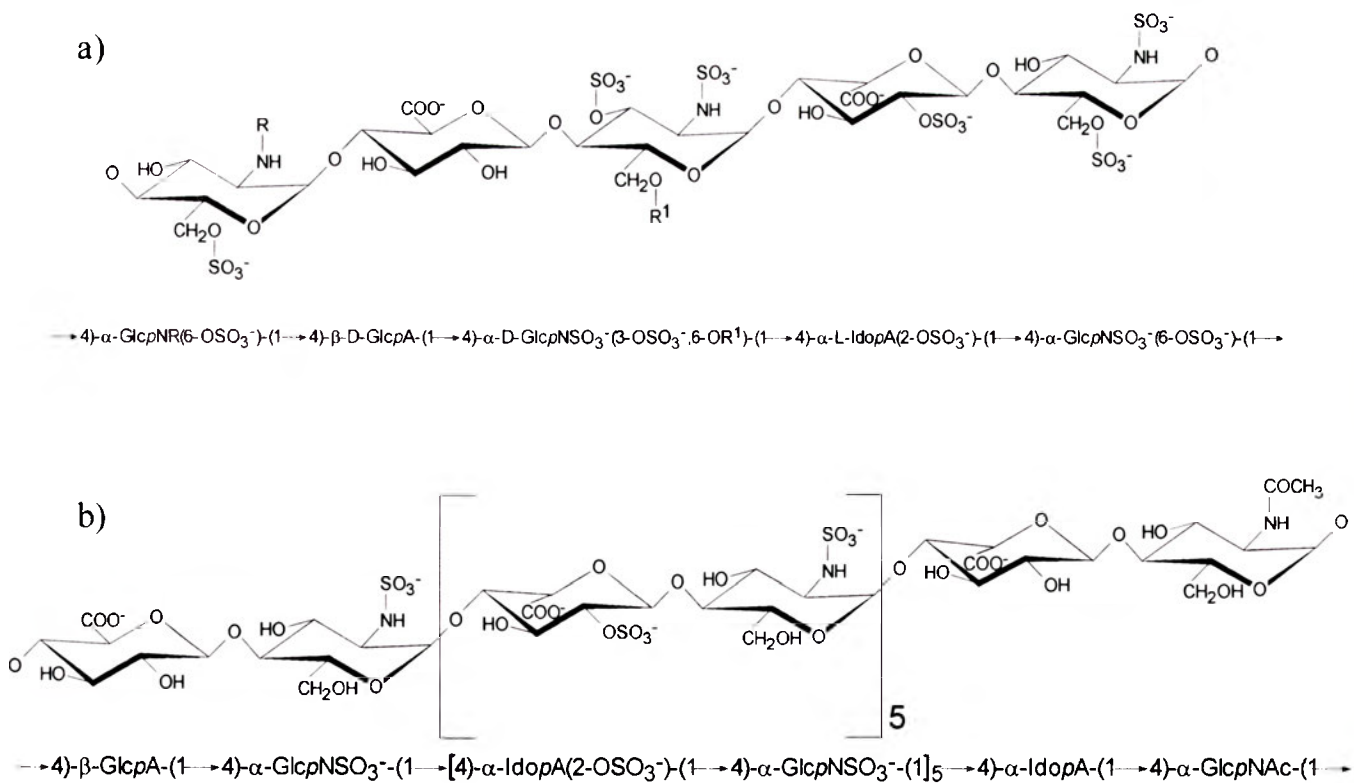
1. chondroityno-4-siarczany — reszta siarczanowa przyłączona jest do grupy hydroksylowej przy 4 atomie węgla (C-4) heksozoaminy,
2. chondroityno-6-siarczany — reszta siarczanowa przyłączona jest do grupy hydroksylowej przy 6 atomie węgla (C-6) heksozoaminy.

W wymienionych glikanach zdarzają się jednak domeny, w których sekwencje disacharydowe nie zawierają reszt siarczanowych oraz takie, w których obie pozycje (C-4 i C-6) w cząsteczce galaktozaminie zajęte są przez grupy siarczanowe [2, 6]. Czasem w obrębie jednego łańcucha chondroitynosiarczanowego występują, roz-

łożone wzdłuż niego nieregularnie, reszty N-acetylogalaktozamin, siarczanowane w różnych pozycjach pierścienia piranozowego [75]. Takie kopolimery są dodatkowo przyczyną heterogenności chondroityno-4 i 6-siarczanów [2, 3, 38, 45]. Na 1 mol disacharydowych sekwencji w siarczanach chondroityny przypada



Ryc. 5. Struktura chemiczna powtarzających się disacharydowych sekwencji, występujących w glikozaminoglikanach. W celu zobrazowania heterogenności tych związków, linią przerywaną oddzielono następną możliwą w łańcuchu GAG resztę monosacharydową. Sekwencje a-f występują w siarczanach heparanu i heparynach, g — w siarczanach keratanu, h-j w siarczanach chondroityny i dermatanu, k — w kwasie hialuronowym; R = H lub SO<sub>3</sub><sup>-</sup>.

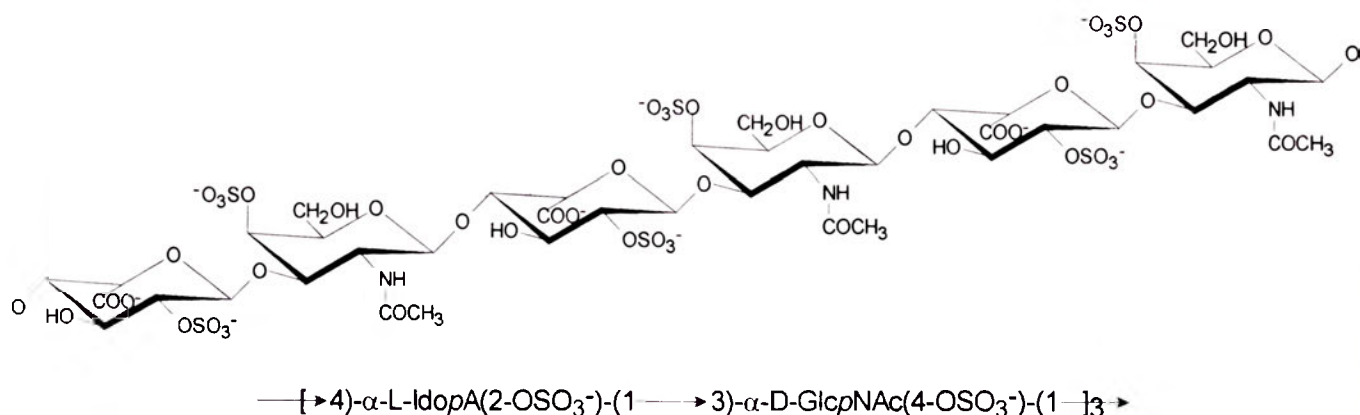


Ryc. 6. Sekwencje oligosacharydowe siarczanów heparanu i heparynu swoiście wiążące niektóre polipeptydy:  
 a) pentasacharyd wiążący antytrombinę III;  $R = SO_3^-$  lub  $COCH_3$ ,  $R^1 = H$  lub  $SO_3^-$ ,  
 b) tetradecasacharyd (Oligo-H) wiążący zasadowy czynnik wzrostowy fibroblastów.

od 0.1 (dla tzw. chondroityny — Ch) do 1.3 (dla tzw. chondroitynosiarczanu D) mola grup siarczanowych, najczęściej 1 mol [2, 13, 38].

Chondroityno-4-siarczany zawierają przede wszystkim reszty kwasu glukuronowego oraz niewielkie ilości reszt kwasu iduronowego (izomeru glukuronianu). Jeśli zawartość tego ostatniego w łańcuchu glikanowym przekracza 10% kwasów heksuronowych, to glikozaaminoglikan taki określa się mianem siarczanu dermatanu (DS; siarczan chondroityny B) [8, 9]. Powstaje on z chondroityno-4-siarczanu w wyniku enzymatycznego procesu epimeryzacji, obejmującego niektóre reszty kwasu glukuronowego (maksymalnie 90% tych reszt) [12]. Wspomniany proces zachodzi z różną częstością wzdłuż łańcucha polisacharydowego, a powstałe reszty iduronianowe mogą dodatkowo

ulegać siarczanowaniu w pozycji C-2 [9, 12, 45]. Disacharydowe sekwencje siarczanów dermatanu (Ryc. 5h-j) mogą zawierać albo resztę N-acetylogalaktozaminy niesiarczanowaną, albo siarczanowaną w pozycji C-4 lub siarczanowaną równocześnie w pozycjach C-4 i C-6 [6, 45]. Na 1 mol tych sekwencji przypada od 1 do 2.5 mola grup siarczanowych [4, 35, 38]. W obrębie jednego łańcucha DS występują domeny o różnej zawartości reszt iduronianowych i różnym stopniu siarczanowania, co jest źródłem heterogenności tego glikanu [2, 5, 7]. Chondroityno-4 i 6-siarczany oraz siarczany dermatanu mają łańcuchy o masach cząsteczkowych w zakresie od 5 do 50 kDa [6, 7, 12]. Działania biologiczne wykazywane przez glikozaaminoglikany chondroityno-dermatanowe przedstawiono w tabeli nr 1.



Ryc. 7. Sekwencja heksasacharydowa siarczanów dermatanu swoiście wiążąca heparynowy kofaktor II.



## II-4. Kwas hialuronowy

Do czwartej grupy glikozoaminoglikanów należy tylko kwas hialuronowy (HA) [8].

Kwas hialuronowy wyizolowany został po raz pierwszy w 1656 roku z pępowiny człowieka jako jeden ze składników „galarety Whartona” [cyt. wg 2]. Ponownie opisali go w 1934 roku Meyer i Palmer [cyt. wg 2]. Omawiany polisacharyd występuje powszechnie w przestrzeni międzykomórkowej kręgowców [24]. Szczególnie dużo jest go w tkance łącznej — przede wszystkim w skórze, ciałku szklistym oka, mazi stawowej, pępowinie i chrząstce [2, 6, 24, 26, 37, 44, 57, 59]. Kwas hialuronowy znaleziono także w streptokokach hemolitycznych (*Aerobacter aerogenes*, *Streptococcus pyogenes*), co pozwala przypuszczać, że reprezentuje on najstarszą formę ewolucyjną glikozoaminoglikanów [2, 38, 43].

Kwas hialuronowy zbudowany jest wyłącznie z reszt kwasu D-glukuronowego oraz reszt N-acetyloglukozaminy. Te pochodne glukozy, połączone wiązaniami glikozydowymi, naprzemiennie 1→3 i 1→4, tworzą nie podlegającą modyfikacjom, disacharydową sekwencję budującą omawiany glikan (Ryc. 5k) [2, 4, 24]. Polisacharydowe łańcuchy kwasu hialuronowego mają masę cząsteczkową od 4 do 8000 kDa [24, 37].

Glikan ten wprawdzie nie tworzy połączeń kowalencyjnych z białkami [24, 26, 37, 55], może jednak wiązać te ostatnie w sposób niekowalencyjny. Przykładem tego typu struktur są połączenia HA z albuminami czy białkami rdzeniowymi niektórych proteoglikanów (zwłaszcza proteoglikanów chrząstki określanych mianem agrekanów) [6, 55, 57, 59].

W roztworach wodnych, *in vitro* oraz *in vivo*, cząsteczki kwasu hialuronowego przyjmują konformację sztywnej, lewoskrętnej helisy, stabilizowanej przez mostki wodorowe, przebiegające równoległe do jej osi głównej [26, 37, 44, 76, 77]. Omawiana struktura drugorzędowa HA powoduje, że naprzemiennie wzdłuż łańcucha polisacharydowego, eksponowane są hydrofilowe i hydrofobowe powierzchnie pierścieni piranozowych cukrów budujących ten glikan. Obecność w HA ugrupowań hydrofobowych sprzyja tworzeniu agregatów, składających się z dwu lub większej liczby cząsteczek kwasu hialuronowego [26, 37, 76, 77]. Konsekwencją zjawiska samoagregacji może być — wg Scotta [26, 78] — możliwość tworzenia przez opisywany glikan uporządkowanych struktur przestrzennych, zwłaszcza w ciałku szklistym oka.

Helikalna cząsteczka kwasu hialuronowego może zmieniać właściwości fizykochemiczne pod wpływem sił działających z zewnątrz [37]. Hialuronian jest zdolny do wiązania znacznych ilości wody [24, 26, 38]. Jednak tylko część cząsteczek wody jest związana z glikanem za pomocą mostków wodorowych, większość z nich jest natomiast mechanicznie unieruchomiona wewnątrz polisacharydowej helisy [26]. Uwodnienie łańcucha cukrowego HA zależy od jego konfor-

macji przestrzennej, na którą z kolei ma wpływ pH i obecność różnych kationów [37].

W organizmach żywych kwas hialuronowy pełni wiele funkcji, opisanych w tabeli nr 1. Wydaje się jednak, że ta główna nadal pozostaje nieznana [24]. Kwas hialuronowy ma także znaczenie w medycynie jako marker niektórych chorób (schorzenia reumatyczne, schorzenia wątroby, namnażanie komórek nowotworowych) [24, 37, 79]. Jest także stosowany jako lek oftalmologiczny i przeciwrumatyczny [24, 80].

Artykuł otrzymano 17 czerwca 1994 r.

Zaakceptowano do druku 31 stycznia 1995 r.

## Piśmiennictwo

1. Jeanloz RW (1960) *Arthritis Rheum* 3: 323-327
2. Kennedy JF (1979) W: *Proteoglycans — biological and chemical aspects in human life*. Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam-Oxford-New York
3. Erzinkjan KL, Trapkov VA (1988) *Izv Akad Nauk SSSR, Ser Biol* 3: 334-345
4. Jackson RL, Busch SJ, Cardin AD (1991) *Physiol Rev* 71: 481-525
5. Kodama C, Kodama T (1988) *J Chromatogr* 429: 239-313
6. Carney SL, Muir H (1988) *Physiol Rev* 68: 858-910
7. Lindahl U, Höök M (1978) *Annu Rev Biochem* 47: 385-417
8. Scott JE (1988) *Biochem J* 252: 313-323
9. Kjellen L, Lindahl U (1991) *Annu Rev Biochem* 60: 443-475
10. Jolles P, (red) (1994) W: *Proteoglycans*. Birkhauser Verlag, Basel
11. Żak I (1990) W: *Glikoproteiny ssaków*. PWN, Warszawa, str 50-88
12. Stoddard RW (1984) W: *The biosynthesis of polysaccharides*. MacMillan Publishing Company, New York, str 200-209
13. Hardingham TE (1986) W: *Connective tissue: biological and clinical aspects*. Kühn K, Krieg T (red) Karger, Basel, str 143-183
14. Gallagher JT, Lyon M, Steward WP (1986) *Biochem J* 236: 313-325
15. Lindahl U (1990) *Haemostasis* 20 (Suppl 1): 146-153
16. Kresse H, Hausser H, Schönherr E, Bittner K (1994) *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 32: 259-264
17. Yanagishita M, Hascall VC (1992) *J Biol Chem* 267: 9451-9454
18. Yanagishita M (1992) *Adv Exp Med Biol* 313: 113-120
19. Yanagishita M (1993) *Acta Pathol Japon* 43: 283-293
20. Templeton DM (1992) *Crit Rev Clin Lab Sci* 29: 141-181
21. Wight TN, Heinegard DK, Hascall VC (1991) W: *Cell biology of extracellular matrix*. Wyd. 2, Hay ED (red) Plenum Press, New York-London, str 45-78
22. Gallagher JT, Turnbull JE, (1992) *Glycobiology* 2: 523-528
23. Klewes L, Prehm P (1994) *J Cell Physiol* 160: 539-544
24. Laurent TC, Fraser JRE (1992) *FASEB J* 6: 2397-2404
25. Reed RK, Laurent UBG (1992) *Am Rev Respir Dis* 146: S37-S39
26. Scott JE (1992) *FASEB J* 6: 2639-2645
27. Evered D, Whelan J (red) (1989) W: *The biology of hyaluronan*. John Wiley & Sons, Chichester-New York-Brisbane-Toronto-Singapore
28. Roszkowska W, Worowski K (1984) *Post Hig Med Dośw* 38: 73-124
29. Gallagher JT, Turnbull JE, Lyon M (1992) *Int J Biochem* 24: 553-560
30. Ruoslahti E (1989) *J Biol Chem* 264: 13369-13372
31. Guido D (1991) *Biochem Soc Trans* 19: 816-820
32. Fedarko NS, Conrad HE (1986) *J Cell Biol* 102: 587-599
33. Margolis RK, Margolis RU (1993) *Experientia* 49: 429-446

34. Paulsson M (1992) *Crit Rev Biochem Mol Biol* **27**: 93-127
35. Höök M, Kjellen L, Johansson S, Robinson J (1984) *Annu Rev Biochem* **53**: 847-869
36. Noonan DM, Fulle A, Valente P, Cai S, Horigan E, Sasaki M, Yamada Y, Hassell JR (1991) *J Biol Chem* **266**: 22939-22947
37. Comper WD, Laurent TC (1978) *Physiol Rev* **58**: 255-315
38. Skop B, Drózdź M, Żak I (1989) *Post Hig Med Dośw* **43**: 329-347
39. Roden L, Ananth S, Campbell P, Curenton T, Ekborg G, Manzella S, Pillion D, Meezan E (1992) *Adv Exp Med Biol* **313**: 1-20
40. Lindahl U, Feingold DS, Roden L (1986) *TIBS* **11**: 221-225
41. Humpries DE, Stevens RL (1992) *Adv Exp Med Biol* **313**: 59-68
42. Wight TN (1989) *Arteriosclerosis* **9**: 1-20
43. Kittick P-D (1985) W: Glycosaminoglycans. Recent biochemical results in the fields of growth and inflammation. VEB Gustav Fischer Verlag, Jena
44. Beaty NB, Mello RJ (1987) *J Chromatogr* **418**: 187-222
45. Fransson L-A (1987) *TIBS* **12**: 406-411
46. Turnbull JE, Gallagher JT (1993) *Biochem Soc Trans* **21**: 477-482
47. Jaques LB (1991) *Semin Thromb Hemost* **17** (Suppl 1): 1-8
48. Bourin M-C, Lindahl U (1993) *Biochem J* **298**: 313-330
49. Zhou F, Hook T, Thompson JA, Hook M (1992) *Adv Exp Med Biol* **313**: 141-154
50. Broze GJ, Wesselschmidt R, Higuchi D, Girard T, Kikert K, MacPhail L, Wun T-C (1992) *Adv Exp Med Biol* **313**: 189-198
51. Dickenson JM, Morris HG, Nieduszynski IA, Huckerby TN (1990) *Anal Biochem* **190**: 271-275
52. Stuhlsatz HW, Keller R, Becker G, Oeben M, Lennartz L, Fisher DC, Greiling H (1989) W: Keratan sulphate. Chemistry, biology, chemical pathology. Greiling H, Scott JE (red) The Biochemical Society, London, str 1-11
53. Funderburgh JL, Conrad GW (1990) *J Biol Chem* **265**: 8297-8303
54. Funderburgh JL, Funderburgh ML, Mann MM, Conrad GW (1991) *Biochem Soc Trans* **19**: 871-876
55. Hardingham TE, Fosang AJ (1992) *FASEB J* **6**: 861-870
56. Hascall VC, Midura RJ (1989) W: Keratan sulphate. Chemistry, biology, chemical pathology. Greiling H, Scott JE (red) The Biochemical Society, London, str 66-75
57. Lohmander S (1988) *Bailliere's Clin Rheum* **2**: 37-62
58. Thonar EJ-M, A, Glant T (1992) *Clin Biochem* **25**: 175-180
59. Kuettner KE (1992) *Clin Biochem* **25**: 155-163
60. Mow Van C, Ratcliffe A, Poole AR (1992) *Bio-materials* **13**: 67-97
61. Scott JE (1987) *Trends Biochem Sci* **12**: 318-321
62. Greiling H, Scott JE (red) (1989) W: Keratan sulphate. Chemistry, biology, chemical pathology. The Biochemical Society, London
63. Scott JE (1991) *Biochem Soc Trans* **19**: 877-881
64. Seibel MJ, Towbin H, Braun DG, Kiefer B, Muller W, Paulsson M (1989) W: Keratan sulphate. Chemistry, biology, chemical pathology. Greiling H, Scott JE (red) The Biochemical Society, London, str 191-198
65. Caterson B, Brooks K, Sattsangi S, Ratcliffe A, Hardingham T, Muir H (1989) W: Keratan sulphate. Chemistry, biology, chemical pathology. Greiling H, Scott JE (red) The Biochemical Society, London, str 199-203
66. Davidson EA, Meyer K, (1954) *J Biol Chem* **211**: 605-611
67. Kresse H, Hausser H, Schonherr E (1993) *Experientia* **49**: 403-416
68. Bernfield M, Kokenyesi R, Kato M, Hinkes MT, Spring J, Gallo RL, Lose EJ (1992) *Annu Rev Cell Biol* **8**: 365-393
69. Upholt WB, Chandrasekaran L, Tanzer ML, (1993) *Experientia* **49**: 384-392
70. Heinegard D, Oldberg A (1989) *FASEB J* **3**: 2042-2051
71. Sandberg MM, Aro HT, Vuorio EI (1993) *Clin Orthop* **289**: 292-312
72. Young MF, Kerr JM, Ibaraki K, Heegaard A-M, Robey PG (1992) *Clin Orthop* **281**: 275-294
73. Morales TI, Hascall VC (1989) *Arthritis Rheum* **32**: 1197-1201
74. Wład H (1988) *Pol Tyg Lek* **43**: 1075-1078
75. Faltynek CR, Sibert JE (1978) *J Biol Chem* **253**: 7646-7651
76. Millane RP, Arnott S (1991) *Adv Exp Med Biol* **302**: 785-803
77. Hopfinger AJ (1977) Intermolecular interactions and biomolecular organization. John Wiley and Sons Inc, New York-London-Sydney-Toronto, str 215-238
78. Scott JE (1992) *Eye* **6**: 553-555
79. Engstrom-Laurant A (1989) W: The biology of hyaluronan. Evered D, Whelan J (red) John Wiley & Sons, Chichester-New York-Brisbane-Toronto-Singapore, str 233-247
80. Balazs EA, Denlinger JL (1989) W: The biology of hyaluronan. Evered D, Whelan J (red) John Wiley & Sons, Chichester-New York-Brisbane-Toronto-Singapore, str 265-280
81. Guido D (1992) *Adv Exp Med Biol* **313**: 69-78
82. Turnbull JE, Fernig DG, Ke Y, Wilkinson MC, Gallagher JT (1992) *J Biol Chem* **267**: 10337-10341
83. Walker A, Turnbull JE, Gallagher JT (1994) *J Biol Chem* **269**: 931-935
84. Maccarana M, Casu B, Lindahl U (1993) *J Biol Chem* **268**: 23898-23905
85. Nietfeld JJ (1993) *Experientia* **49**: 456-469
86. Busch SJ, Martin GA, Barnhart RL, Mano M, Cardin AD, Jackson RL (1992) *J Cell Biol* **116**: 31-42
87. Cardin AD, Weintraub HJR (1989) *Arteriosclerosis* **9**: 21-32
88. Sakamoto S, Sakamoto M, Goldhaber P, Glimcher MJ (1975) *Biochim Biophys Acta* **385**: 41-50
89. Górski A. (1990) *Pol Arch Med Wewn* **83**: 208-211
90. Ekre H-P, Naparstek Y, Lider O, Hyden P, Hagermark O, Nilsson T, Vlodavsky I, Cohen I (1992) *Adv Exp Med Biol* **313**: 329-340
91. Saxena U, Klein MG, Goldberg IJ (1989) *J Biol Chem* **265**: 12880-12886
92. Lutz W, Jażdżewski B, Grande G (1981) *Pol Tyg Lek* **36**: 575-578
93. Le Boeuf RD, Gregg RR, Weigel PH, Fuller GM (1987) *Biochemistry* **26**: 6052-6057
94. Weigel PH, Frost SJ, Le Boeuf RD, McGary CT (1989) W: The biology of hyaluronan. Evered D, Whelan J (red) John Wiley & Sons, Chichester-New York-Brisbane-Toronto-Singapore, str 248-264
95. Underhill C (1992) *J Cell Sci* **103**: 293-298
96. Underhill C (1993) *J Invest Dermatol* **101**: 820-826
97. Mast BA, Diegelmann RF, Krummel TM, Cohen IK (1993) *Matrix* **13**: 441-446
98. Mast BA, Diegelmann RF, Krummel TM, Cohen IK (1992) *Surgery* **174**: 441-451

## Lipidy — liposomy — błony biologiczne

## Lipids — liposomes — biological membranes

JOANNA BANDOROWICZ-PIKUŁA\*

**MOLEKULARNA ORGANIZACJA KOMÓRKI, t. II. LIPIDY, LIPOSOMY i BŁONY BIOLOGICZNE**, skrypt do ćwiczeń pod redakcją Arkadiusza Kozubka, Wydawnictwo Uniwersytetu Wrocławskiego, Wrocław, 1993; 115 stron, 25 rycin, 7 tabel  
Arkadiusz Kozubek, Aleksander F. Sikorski, Jan Szopa

*The emergence of lipid dynamics as one of the most exciting new directions of biomembrane research (...) integrates lipid biochemistry with cell biology*

*Laurens L. M. van Deenen, 1994 [1]*

Komórki wszystkich żyjących na naszej planecie organizmów składają się w większości z wody. Zatem lipidy komórkowe, związki w wodzie praktycznie nierozpuszczalne, mają tendencję do tworzenia, dzięki efektowi hydrofobowemu [2, 3], wielocząsteczkowych struktur na granicy faz ciecz-powietrze. Struktury te zapewniają minimum kontaktu pomiędzy cząsteczkami rozpuszczalnika a cząsteczkami lipidów. Ich powstawanie leży u podstaw koncepcji błony biologicznej, jako ciągłej dwuwarstwy lipidowej stanowiącej półprzepuszczalną barierę, a jednocześnie będącej podłożem dla powierzchniowych i integralnych białek błonowych. Model płynnej mozaiki, w swej ostatecznej formie zaproponowany blisko ćwierć wieku temu przez Singera i Nicolsona [4], przetrwał w swej istocie dotyczącej dynamiki składników próbę czasu i próbę eksperymentu. Do dziś więc uważa się, że błona biologiczna to przede wszystkim dwuwarstwa lipidowa, istniejąca w warunkach fizjologicznych głównie w stanie ciekło-kryształicznym (w fazie płynnej,  $L_2$ ), i że białka błonowe są w różnym stopniu w dwuwarstwie lipidowej błony zanurzone, w niej zakotwiczone lub z nią zasocjowane [2, 3, 5-8].

Z drugiej strony jednak, ostatnie ćwierćwiecze badań w sposób diametralny zmieniło nasze spojrzenie na lipidy jako związki zapewniające jedynie wygodne środowisko dla białek strukturalnych, transportowych czy enzymów szlaków metabolicznych komórki. Zróż-

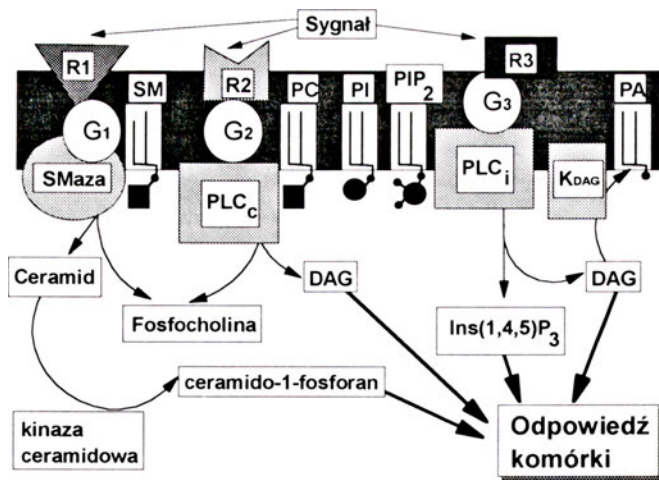
nicowanie strukturalne, nie dorównujące być może białkom i kwasom nukleinowym, ale prawie tak bogate, oraz polimorfizm lipidów złamały utarty pogląd, że lipidy jako substancje hydrofobowe, tworzą kanoniczną, ciągłą dwuwarstwę o stosunkowo łatwych do przewidzenia cechach fizycznych. W tym przypadku stwierdzono, że dwuwarstwa jest tylko jedną, na pewno nie jedyną możliwą z termodynamicznego punktu widzenia, strukturą przyjmowaną przez lipidy [2, 3, 8].

Katalog nieprzewidywalnego, z perspektywy minionego ćwierćwiecza, w lipidologii obejmuje między innymi:

- i) odkrycie asymetrycznego rozmieszczenia lipidów w błonie — asymetria transwersalna oraz odpowiedzialna za to zjawisko, zależna od ATP translokaza aminofosfolipidów [9, 10] i asymetria w płaszczyźnie błony (mikrodomeny fosfolipidowe) [7, 11] — wraz ze wszystkimi implikacjami funkcjonalnymi tego zjawiska;
- ii) charakterystyka specyficznych oddziaływań pomiędzy lipidami i białkami — szczególnie odkrycie rodzin białek wiążących lipidy, takich jak aneksyny [12], izoformy kinazy białkowej C [13], białka cytoszkieletu [14] czy fosfolipazy komórkowe [15];
- iii) transport lipidów oraz ich udział w fuzji błon, w procesach endo- i egzocytozy [2, 3, 5, 16];
- iv) lipidy jako wtórne przekaźniki informacji w komórce (niektóre przykłady takich związków podano na rycinie 1) [3, 17-21].

Polskojęzyczne opracowania na temat lipidów są nieliczne i bardzo często nieznane szerszemu gronu Czytelników. Dość regularnie tematyce tej poświęcają

\* Dr, Zakład Biologii Komórki, Instytut Biologii Doświadczalnej im. Marceliego Nenckiego PAN w Warszawie.



Ryc. 1. Lipidowe wtórne przekąźniki informacji w komórce (opracowano na podstawie [3, 17-21]).

Objaśnienia skrótów: R1, R2, R3, receptory błonowe; G1, G2, G3, białka G; PLC<sub>c</sub>, PLC<sub>i</sub>, fosfolipaza C specyficzna w stosunku do fosfatydylocholina (c) lub do fosfatydyloinozytolu (i); SMaza, sfingomielinaza; K DAG, kinaza diacyloglicerolu; Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>, inozytolo-1,4,5-trisfosforan; PI, fosfatydyloinozytol; PIP<sub>2</sub>, fosfatydyloinozytolo-4,5-bisfosforan; PC, fosfatydylocholina; PA, kwas fosfatydowy; SM, sfingomielina; DAG, diacyloglicerol.

swe łamy *Postępy Biochemii* i *Postępy Biologii Komórki*, ale w przypadku wymienionych czasopism chodzi raczej, zgodnie z ich profilem, o nowiny poznawcze niż aspekty metodyczne, tak ważne przecież w pracy badawczej każdego biochemika, biologa molekularnego czy biologa komórki. Wydaje się, że zapotrzebowanie jakie istnieje na tego rodzaju opracowania, przynajmniej w części wypełnia praca Arkadiusza Kozubka, Aleksandra F. Sikorskiego i Jana Szopy, *Lipidy, liposomy i błony biologiczne* (Molekularna organizacja komórki, część II).

Skrypt podzielony jest na trzy części: Lipidy, Błony biologiczne i Elementy technologii liposomowej, poprzedzone Wstępem i zakończone Dodatkiem. We Wstępie autorzy skryptu wprowadzają Czytelnika w tematykę lipidową, podając definicję lipidów i krótką historię badań tych związków oraz rolę lipidów w organizmach żywych. Pierwsza, najdłuższa część, zawiera dziewięć rozdziałów. Jako motto autorzy traktują przyczyny zaniedbań w badaniach lipidów. Część praktyczną uzupełnia fragment teoretyczny na temat struktury 17-tu klas lipidów. Kolejne ćwiczenia stanowią logiczny ciąg, począwszy od ekstrakcji lipidów z materiału biologicznego, ich rozdziału i analizy, poprzez oznaczanie składu reszt kwasów tłuszczowych, w di-, triglicerydach i fosfolipidach, ilościowe metody analizy lipidów, analizę jakościową z zastosowaniem chromatografii cienkowarstwowej, badania amfifilowych właściwości lipidów i ich utleniania, a skończywszy na pomiarze aktywności lipooksygenazy i wybranych enzymów metabolizmu lipidów. W drugiej części dotyczącej błon biologicznych autorzy proponują ćwiczenia praktyczne mające na celu zapoznanie studentów ze składem białkowym i lipidowym błony erytrocytów, z metodami analizy półprzepuszc-

zalnych właściwości błon biologicznych, z metodami badania płynności dwuwarstwy lipidowej, a także z zastosowaniem liposomów w badaniach fuzji błon biologicznych. Ostatnia, trzecia część, Elementy technologii liposomowej, przedstawia techniki preparacji liposomów, pokazuje jak wyznaczyć objętość zamkniętą liposomów oraz jak określić ich trwałość i stabilność. W Dodatku, znajdującym się na końcu skryptu, autorzy zamieścili wybrane właściwości fizyko-chemiczne lipidów i związków powierzchniowo czynnych, które mogą być przydatne nie tylko dla studentów wykonujących ćwiczenia, ale również dla wszystkich zajmujących się badaniami lipidów i błon biologicznych. Każdemu zestawowi ćwiczeń towarzyszy oryginalna literatura fachowa i teoretyczne wprowadzenie, które pomaga zrozumieć istotę stawianych problemów i tok postępowania. Korzystanie z pracy ułatwiają dobrze skonstruowane tabele i rysunki. Wszystkie ćwiczenia przedstawione są według przejrzystego schematu wyodrębniającego materiały i odczynniki, sprzęt oraz w jasny sposób wypunktowane kolejne etapy wykonywanego zadania.

Skrypt jest niewątpliwie wartościową pozycją, której nie było dotychczas na polskim rynku wydawniczym. Dlatego może być cenną pomocą dla studentów, ale również dla badaczy, którzy nie tylko od czasu do czasu, ale na codzień mają praktyczną styczność z tematyką lipidową.

## Piśmiennictwo

1. van Deenen LLM (1994) W: Hoekstra D (red) *Current Topics in Membranes* t 40. Academic Press, San Diego, New York, Boston, London, Sydney, Tokyo, Toronto, str 1-3
2. Gennis RB (1989) W: Cantor CR (red) *Springer Advanced Texts in Biochemistry*. Springer-Verlag, New York, Berlin, Heidelberg, London, Paris, Tokio, str 533
3. Vance DE, Vance J, (red.) (1991) *New Comprehensive Biochemistry* t 20. Elsevier, Amsterdam, London, New York, Tokyo, str 596
4. Singer SJ, Nicolson GL (1972) *Science* 175: 720-731
5. Dawidowicz EA (1993) *Curr Opin Struct Biol* 3: 495-498
6. Thompson TE (1993) *Curr Opin Struct Biol* 3: 473-474
7. Vaz WLC, Almeida PFF (1993) *Curr Opin Struct Biol* 3: 482-488
8. Hoekstra D, red (1994) *Current Topics in Membranes* t 40. Academic Press, San Diego, New York, Boston, London, Sydney, Tokyo, Toronto, str 638
9. Devaux PF (1991) *Biochemistry* 30: 163-1173
10. Zachowski A (1993) *Biochem J* 294: 1-14
11. Jacobson K, Vaz WLC, red (1992) *Comm Mol Cell Biophys* 8: 1-114
12. Moss SE, red (1992) *The Annexins*. Portland Press, London, Chapel Hill, str 173
13. Nishizuka Y (1988) *Nature* 334: 661-665
14. Luna EJ, Hitt AL (1992) *Science* 258: 955-964
15. Waite M (1991) W: Vance DE, Vance J, (red) *New Comprehensive Biochemistry* t 20. Elsevier, Amsterdam, London, New York, Tokyo, str 269-296
16. White JM (1992) *Science* 258: 917-923
17. Gill DI (1989) *Nature* 342: 16-18
18. Kolesnick (1991) *Prog Lipid Res* 30: 1-38
19. Poddana H, Barańska J (1991) *Post Biochem* 37: 2-5
20. Sweeley CHC (1994) W: Hoekstra D (red) *Current Topics in Membranes* t 40. Academic Press, San Diego, New York, Boston, London, Sydney, Tokyo, Toronto, str 357-360
21. Diveche N, Irvine RF (1995) *Cell* 80: 269-270

# SPRAWOZDANIE

z działalności Polskiego Towarzystwa Biochemicznego  
w roku 1994

## Działalność organizacyjna

### 1. Skład osobowy Zarządu Głównego

Prezydium: prezes — prof. Liliana Konarska  
wiceprezes — prof. Zofia Poremska  
sekretarz — dr Ewa Turska  
skarbnik — doc. Jolanta Barańska

Członkowie Z.G.: prof. Edward Bańkowski Białystok  
prof. Andrzej Guranowski Poznań  
dr Maria Kołaczkowska Wrocław  
prof. Michał Komoszyński Toruń  
prof. Antoni Polanowski Wrocław  
prof. Marta Stryjecka-Zimmer Lublin  
prof. Roman Tarnawski Katowice  
dr hab. Marianna Turkiewicz Łódź  
prof. Tomasz Twardowski Poznań  
dr Teresa Wesołowska Szczecin  
doc. Maria Wojtaś-Wasilewska Lublin  
prof. Krzysztof Zwierz Białystok

Zarząd Główny działa poprzez Oddziały Terenowe usytuowane:

w Gdańsku	Przewodniczący prof. W. Makarewicz
Toruniu	dr A. Leźnicki
Krakowie	prof. Z. Żak
Katowicach	dr hab. K. Olczyk
Lublinie	dr M. Sanecka-Obacz
Łodzi	prof. S. Bielecki
Olsztynie	prof. J. Glogowski
Wrocławiu	doc. M. Malicka-Błaszkiwicz
Warszawie	prof. B. Grzelakowska-Sztabert
Białymstoku	prof. K. Zwierz
Poznaniu	prof. W. Walerych

Kierownik Biura Zarządu Głównego — Weronika Kamińska

Komisja Rewizyjna prof. Magdalena Fikus  
prof. Anna Barańczyk-Kuźma  
prof. Marian Wolny

Zarząd Główny współpracując z Zarządami Oddziałów prowadził działalność statutową Towarzystwa poprzez Sekcje, Komisje i Zespoły powołane do zadań szczegółowych. Jak co roku, zgodnie ze Statutem, odbyły się cztery plenarne posiedzenia Zarządu Głównego z udziałem przedstawicieli Oddziałów oraz dwa posiedzenia Prezydium Zarządu Głównego.

Dyżury członków Prezydium odbywały się we wtorki w biurze Zarządu Głównego, które mieści się w małym budynku Instytutu Biologii Doświadczalnej PAN im. M. Nenckiego przy ul. Pasteura 3, pokój 633, telefon 658-20-99, FAX 22-53-42,

## WAŻNIEJSZE UCHWAŁY ORGANÓW STATUTOWYCH TOWARZYSTWA

1. Podwyższenie składki członkowskiej za rok 1995, (wnoszonej po 28 lutego 1995) z 10 zł do 15 zł. Członkowie studenci płacą 5 zł.
2. Powołanie Konkursu im. prof. Janiny Opieńskiej-Blauth na wniosek Luelskiego Środowiska Biochemicznego. Na podstawie opracowanego i przyjętego przez Zarząd Główny regulaminu, nagroda jest przyznawana studentom za szczególnie wartościowe prace badawcze, zgłoszone i przedstawione na dorocznym Zjeździe PTBioch.

Pierwszy Konkurs odbył się podczas XXX Zjazdu naszego Towarzystwa w Szczecinie.

3. Zatwierdzenie regulaminu nagrody im. prof. Antoniego Dmochowskiego, która przyznawana będzie

w drodze konkursu za szczególne osiągnięcia dydaktyczne w dziedzinie biochemii. Inicjatorem nagrody jest Łódzki Oddział PTBioch.

W poczet członków PTBioch w 1994 r. przyjęto łącznie 83 osoby w tym 29 otrzymało status członka-studenta.

## **DZIAŁALNOŚĆ ORGANIZACYJNO-NAUKOWA TOWARZYSTWA**

### **DOROCZNY ZJAZD OGÓLNOPOLSKI, SESJE I KONFERENCJE**

1. XXX Zjazd Towarzystwa odbył się w dn. 14-16 września 1994 r. w Szczecinie z udziałem około 800 uczestników z kraju i zagranicy. Obrady odbyły się w ramach 12 sympozjów p.t.

- Molekularne mechanizmy karcinogenezy
- Regulacja wytwarzania energii w komórce
- Molekularne i biochemiczne aspekty wirusowych i bakteryjnych chorób zwierząt
- Molekularne i regulacyjne aspekty systemów transportu jonów
- Biologiczne zagrożenie związkami fluoru
- Metabolizm lipoprotein
- Składniki łącznotkankowe ściany naczyniowej
- Pierwiastki śladowe w organizmach i środowisku
- Biochemia mięśnia
- Wolne rodniki w medycynie i biologii
- Lektyny, selektyny i ich funkcje
- Doniesienia różne

Program Zjazdu został wzbogacony organizacją dwóch sympozjów satelitarnych:

„Biologiczne i patofizjologiczne aspekty regulacji ustrojowej” Organizator — prof. Tomasz Tyrakowski ze Szczecina „Glikozylacja i glikokoniugaty w fizjologii i patologii” Organizatorzy: prof. Jerzy Kościelak z Warszawy i prof. Elwira Lisowska z Wrocławia

Wyniki prac badawczych przedstawiono na Zjeździe ustnie oraz w formie plakatów. Zaprezentowano 671 referatów i doniesień.

Organizatorzy zainteresowali ośrodki masowego przekazu programem Zjazdu, zapraszając dziennikarzy na konferencję prasową. W ten sposób poprzez notatki i wywiady w prasie wyjaśniono społeczeństwu cel pracy badawczej biochemików i możliwości praktycznego wykorzystania ich osiągnięć w różnych dziedzinach gospodarki.

Coroczne Zjazdy Towarzystwa cieszą się niesłabnącym zainteresowaniem. Coraz liczniejszy jest udział młodych pracowników nauki i studentów oraz gości, przedstawiciele pokrewnych dyscyplin naukowych.

## **DZIAŁALNOŚĆ WYDAWNICZA**

1. Postępy Biochemii

Wydano 4 zeszyty Postępów Biochemii. Kwartalnik jest dotowany przez KBN. Pismo rozwija się pomyślnie, w obecnej formie dostarcza najnowszych informacji z dziedziny biochemii, biologii molekularnej i genetyki. Jest cenną pomocą do nauki dla studentów Wydziałów Biologicznych i Akademii Medycznych. Jest uzupełnieniem podręczników akademickich.

2. Acta Biochemica Polonica

Acta Biochemica Polonica jest kwartalnikiem publikującym oryginalne prace doświadczalne w języku angielskim. Od listopada 1992 r. Acta Biochemica Polonica jest wydawana przez Polskie Towarzystwo Biochemiczne wspólnie z Komitetem Biochemii i Biofizyki PAN. W 1994 r. wydano 4 zeszyty kwartalnika z pomocą finansową KBN

3. Listy do Członków

Biuletyn jest redagowany przez dr Teresę Wesołowską i wydawany w Szczecinie. Informuje o działalności naszego Towarzystwa i innych Towarzystw. Wychodzi systematycznie, a życzliwy stosunek Redaktora do Czytelników sprzyja integracji członków naszego Towarzystwa.

## **NAGRODY**

Nagrody: im. prof. Jakuba Parnasa za najlepszą pracę doświadczalną z zakresu biochemii wykonaną w pracowni na terenie Polski oraz im. prof. Bolesława Skarżyńskiego za najlepszy artykuł przeglądowy opublikowany w „Postęпах Biochemii” są przyznawane regulaminie. Nagrodę im. prof. Włodzimierza Mozolowskiego otrzymuje corocznie młody biochemik na Zjeździe Towarzystwa za najciekawszą i najlepszą prezentowaną pracę

W roku bieżącym nagrodę w konkursie im. prof. Jakuba Parnasa Z.G.PTBioch. przyznał na wniosek komisji, zespołowi: Hanna Strzelecka-Golaszewska, Joanna Moraczewska, Sofia Khaitlina, Małgorzata Mossakowska za publikację: „Localization of the tightly bound divalent-cation-dependent and nucleotide-dependent conformation changes in C-actin using limited proteolytic digestion”, ogłoszoną w Eur. J. Biochem. 1993, 211, 731-742.

Nagrodę w Konkursie im. prof. Bolesława Skarżyńskiego za najlepszy artykuł przeglądowy otrzymał dr Andrzej Kutner z Instytutu Farmaceutycznego w Warszawie za publikację: „Analogi witamin D o działaniu antyproliferacyjnym” (Postępy Biochemii 39 t, Nr. 1, 39-45 z 1993 r.)

W konkursie im. Włodzimierza Mozołowskiego na najlepszą pracę młodych biochemików (do 30 lat) przedstawioną na XXX Zjeździe PTBioch. w Szczecinie, Komisja nagrodziła:

I nagrodą — Wojciecha Musiała z Poznania za pracę pt. „Transformacja tytoniu *Nicotiana tabacum* genem białka otoczki wirusa ospowatości śliwy” oraz za współautorstwo w pracy „Ekspresja genu białka otoczki wirusa ospowatości śliwy w transformantach *N. tabacum*”.

Wyróżnienie otrzymał Sławomir Dąbrowski z Gdańska za przygotowanie i wygłoszenie komunikatu pt. „Badanie produktów PCR genu kodującego ludzką amylogeninę” i Barbara Niewczas z Warszawy za pracę „Regulacja kanału wapniowego na błonie komórkowej hepatomy H-35”

Podczas tegorocznego Zjazdu PTBioch. w Szczecinie po raz pierwszy przeprowadzono konkurs im. Janiny Opieńskiej-Blauth. Nagrody za szczególnie wartościowe prace badawcze, zgłoszone i przedstawione przez studentów przyznano:

I nagrodę Annie Herman z Gdańska za pracę pt. „Kontrola replikacji DNA przez czterofosforan guanozyny w komórce *Escherichia coli*”.

Trzy równorzędne II nagrody:

— Maciejowi Królowi z Łodzi za pracę: „Wpływ ambroksolu na wewnątrzkomórkowe stężenie wapnia w ludzkich granulocytach obojętnochłonnych po stymulacji peptydem chemotaktycznym FMLP i konkawaniną A.”

— Sławomirowi Majdanikowi z Lublina za pracę „Wpływ DMSO na aminoacylację tRNA.”

— Aleksandrze Rojek z Warszawy za pracę „Wpływ ATP i tapsigarginy na uwalnianie  $Ca^{2+}$  z wewnątrzkomórkowych magazynów oraz na wnikanie zewnątrzkomórkowego  $Ca^{2+}$  do cytosolu komórek glejaka C6”.

Wszyscy studenci uczestniczący w konkursie otrzymali certyfikaty udziału w I edycji konkursu.

Nagrodę za najlepszą prezentację posteru — Model cząsteczki DNA — ufundowaną przez firmę M&C Lab. otrzymał zespół kolegów E. Poremba, A. Goździcka -Józefiak, H. Kędzia z Instytutu Biologii Molekularnej i Biotechnologii AM w Poznaniu za pracę „Analiza czynników komórkowych oddziałujących z wirusem HPV 16 w procesie onkogenezy”.

## KONKURS NA NAJLEPIEJ PRZYGOTOWANY I WYGŁOSZONY WYKŁAD

Organizacja konkursów ma na celu popularyzację osiągnięć nauk biologicznych. W 1994 roku dwie równorzędne pierwsze nagrody uzyskali:

Janusz Siedlecki z Centrum Onkologii w Warszawie za wykład pt. „Molekularne podstawy chorób nowotworowych”

Adam Szewczyk z Instytutu Biologii Doświadczalnej PAN Warszawa za wykład pt. „ATP-wewnątrzkomórkowy przekaznik informacji”

Dwie równorzędne drugie nagrody uzyskali:

Mirosława Siatecka, z Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu za wykład pt. „Struktura i właściwości syntetaz aminoacylo-tRNA.”

Eliza Wyszko, z Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu za wykład pt. „Struktura i właściwości czynnika transkrypcyjnego IIIA / TF III A / *Xenopus levis*.”

## STAŻE NAUKOWE

Zarząd Główny Polskiego Towarzystwa Biochemicznego gorąco popiera krajowe i zagraniczne staże naukowe. Współpraca z FEBS rozwija się zadawalająco. W roku 1994, 12 osób przebywało na szkoleniach konferencyjnych organizowanych przez FEBS, oraz na krótko lub długoterminowych stażach naukowych finansowanych przez FEBS.

## REGULAMIN NAGRODY ZA OSIĄGNIĘCIA DYDAKTYCZNE IM. PROF. DR HAB. ANTONIEGO DMOCHOWSKIEGO

1. Intencją nagrody jest:
  - a) podniesienie rangi nauczynia biochemii w ocenie pracowników naukowo-dydaktycznych
  - b) podwyższenie poziomu nauczania biochemii w różnych typach szkół wyższych
  - c) popularyzacja biochemii i dokształcanie różnych grup zawodowych w tej dziedzinie.
2. Nagroda przyznawana będzie w wyniku konkursu za szczególne osiągnięcia dydaktyczne w dziedzinie biochemii. O nagrodę mogą ubiegać się autorzy podręczników, skryptów, cykli publikacji naukowych poświęconych dydaktyce, cykli publikacji popularyzujących wiedzę biochemiczną, a także opublikowanych opracowań programów pracowni eksperymentalnych z biochemii, uwzględniających nowoczesne metody i najnowsze osiągnięcia w tej dziedzinie, realizowanych w warunkach pracowni studenckiej w Polsce.
3. Nagroda jest przyznawana co dwa lata, a prace do niej przedstawiane, obejmują ostatnie dwa lata przed rokiem przystąpienia do konkursu. W przypadku cykli publikacji co najmniej jedna praca powinna ukazać się w ciągu tego okresu. O terminie zgłoszeń na konkurs powiadamia Zarząd Główny Polskiego Towarzystwa Biochemicznego.
4. Nagrodę przyznaje Zarząd Główny Polskiego Towarzystwa Biochemicznego na wniosek powołanej Komisji Oceniającej. Nazwisko osoby nagrodzonej zostaje podane do wiadomości członków Polskiego Towarzystwa Biochemicznego.
5. W skład nagrody wchodzi medal, dyplom oraz kwota pieniężna, której wielkość będzie zależna od posiadanych funduszy.
6. Obok nagrody głównej mogą być przyznawane wyróżnienia.



## Podręcznik laboratoryjny

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

Aby zaprenumerować „Postępy Biochemii” w 1995 r. należy wpłacić odpowiednią kwotę na konto bankowe wydawcy (Polskiego Towarzystwa Biochemicznego) za pomocą przekazu zamieszczonego na odwrocie. Zamówione egzemplarze będziemy wysyłać pocztą na adres podany nam na przekazie. Ponieważ odcinek przekazu docierający do nas jest jednocześnie zamówieniem, prosimy o **bardzo wyraźne** napisanie

imienia, nazwiska (lub nazwy instytucji) i dokładnego adresu wraz z kodem pocztowym (DRUKOWANYMI LITERAMI) na wszystkich trzech odcinkach przekazu.

**Prenumerata krajowa dla instytucji:**  
580 000 zł.

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

**Prenumerując  
„Postępy  
Biochemii”  
wspierasz  
swoje  
czasopismo!**

***Kwartalnik „Postępy Biochemii”  
wydawany z pomocą finansową  
Komitetu Badań Naukowych***

Pokwitowanie dla wpłacającego	Odcinek dla posiadacza rachunku	Odcinek dla poczty lub banku
zł .....	zł .....	zł .....
słownie .....	słownie .....	słownie .....
wpłacający .....	wpłacający .....	wpłacający .....
..... imię, nazwisko, dokładny adres z kodem pocztowym	..... imię, nazwisko, dokładny adres z kodem pocztowym	..... imię, nazwisko, dokładny adres z kodem pocztowym
na rachunek	na rachunek	na rachunek
Polskie Towarzystwo Biochemiczne 02-093 Warszawa, ul. Pasteura 3 P.B.K. XIII/O W-wa, Al. Jerozolimskie 37 00 44-1225-139-11	Polskie Towarzystwo Biochemiczne 02-093 Warszawa, ul. Pasteura 3 P.B.K. XIII/O W-wa, Al. Jerozolimskie 37 00 44-1225-139-11	Polskie Towarzystwo Biochemiczne 02-093 Warszawa, ul. Pasteura 3 P.B.K. XIII/O W-wa, Al. Jerozolimskie 37 00 44-1225-139-11
stempel  ..... podpis przyjmującego	stempel  ..... podpis przyjmującego	stempel  ..... podpis przyjmującego
Pobrano opłatę  zł. ....	Pobrano opłatę  zł. ....	Pobrano opłatę  zł. ....

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

Autorzy artykułu odpowiadają za prawidłowość i ścisłość podawanych informacji oraz poprawność 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 „Postępkach Biochemii”. W przypadku, gdy Autor(z) zamierza(ją) włączyć do swego autora artykułu ilustracje publikowane przez autorów prac cytowanych, należy uzyskać i przekazać nam odpowiednią zgodę na przedruk.

## Redakcja prosi Autorów o przestrzeganie następujących wskazówek szczegółowych:

**TEKST:** Maszynopis powinien być napisany jednostronnie, czcionką wielkości standardowej, z podwójną interlinią, z lewym marginesem ok. 4 cm z trzydziestoma wierszami na stronie i 60 znakami w wierszu (litery + odstęp), odstępy pomiędzy wyrazami powinny odpowiadać jednemu znakowi (nie równać do prawego marginesu).

W tekście nie należy stosować żadnych podkreśleń, ani rozstrzelonego druku. Ewentualne sugestie co do charakteru czcionki drukarskiej mogą Autorzy zaznaczyć ołówkiem na marginesach maszynopisu. W przypadku stosowania w tekście liter alfabetu greckiego trzeba na marginesie wpisać ołówkiem ich fonetyczne brzmienie.

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

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

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

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

**PIŚMIENICTWO:** Wykaz piśmiennictwa obejmuje prace w kolejności ich cytowania w tekście, zaznacza się je liczbami porządkowymi ujętymi w nawiasy kwadratowe, np. [3,7,9,—26]. 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-Holland, Amsterdam
3. Norberth T, Piscator M (1979) W: Friberg L, Nordberg GF, Von VB (red) *Handbook on the Toxicology of Metals*. Elsevier, North-Holland, Amsterdam, str 541-553
4. Delej J, Kesters K (1975) W: Florkin M, Stotz EH (red) *Comprehensive Biochemistry* t 29B. Elsevier, North-Holland Amsterdam, str 1-77
5. Franks NP, Lieb WR (1981) W: Knight CG (red) *Research Monographs in Cell and Tissue Physiology*, t 7. Elsevier, North-Holland, Amsterdam, str 243-272

**ILUSTRACJE:** Ryciny winny być gotowe do reprodukcji. Fotografie czarno-białe (kontrastowe), powinny być wykonane na papierze matowym. Pozostałe ryciny należy wykonać tuszem na białym papierze lub kalce technicznej. Wskazane jest, aby ryciny były dwukrotnie większe od przyszłej reprodukcji, tj. w skali 2:1. Cyfry i litery służące do opisu rysunku powinny mieć wysokość nie mniejszą niż 5 mm. Na rysunkach nie należy umieszczać opisów słownych, lecz posługiwać się skrótami. Osie wykresów winny być opatrzone napisem łatwo zrozumiałym. Decyzję o stopniu zmniejszenia ryciny podejmie redakcja. Ilustracji nie należy włączać w tekst maszynopisu, lecz odpowiednio ponumerować: tabele i ryciny noszą cyfry arabskie, wzory zaś rzymskie. Na marginesie tekstu należy zaznaczyć ołówkiem preferowane miejsce umieszczenia tabeli, rycin, 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 „górną-dół” (ołówkiem na odwrocie). Ze względu na wewnętrzną spójność 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 przesać na adres:

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

