

POSTĘPY BIOCHEMII

PL ISSN
0032-5422

Advances in Biochemistry

TOM 40, NR 2, 1994

Tadeusz Mann — Wspomnienia	70
Sekwencjonowanie przez hybrydyzację	72
Naprawa DNA w genomie ludzkim	77
Mukowiscydoza — terapia genowa	86
Strategie ochrony roślin przed wirusami	91
Cytoplazmatyczne białka motoryczne	96
Proteoglikany heparanosiarczanowe	106
Oligosacharydy glikohormonów	113
Białka w aklimatyzacji roślin .	121

Biospecyficzne czyste
i dokładnie oznaczone
ULTRAPURE BIOREAGENTS



Wysoka i starannie oznaczona czystość, bez zanieczyszczeń aktywnych biologicznie – to szczególna cecha ULTRAPURE BIOREAGENTS. Stosując je w badaniach molekularno-biologicznych ogranicza się zakłócający wpływ zanieczyszczeń wprowadzanych z odczynnikami i w ten sposób unika się powtarzania oznaczeń. Równocześnie znacznie ułatwione jest wykrywanie możliwych błędów doświadczalnych, a wyniki pomiarów zyskują na precyzji. ULTRAPURE BIOREAGENTS posiadają dokładnie oznaczone wszystkie cechy ich aktywności biologicznej. Jednoznacznym dowodem ich jakości jest świadectwo analizy widniejące na etykiecie każdego opakowania. Program i bezpłatne broszury: S. WITKO-EUROCOLOR, skr. poczt. 46, 90-980 Łódź-7, Tel./Fax (042) 84 46 09, 81 31 39, 81 31 40

HPLC bez zakłóceń
przy niezmiennie
wysokiej czystości



Optimal

11 **Acetonitryl** 9017
do wysokosprawnej chromatografii cieczowej M. cz. 41,1
CH₃CN **ULTRA GRADIENT**

„BAKER ANALYZED”[®] HPLC Reagent

ORYGINALNA ANALIZA SERII: LOT G38275 100.0%

Zawartość CH ₃ CN oznaczona metodą GC	100.0%
Absorbancja w UV (w odniesieniu do wody, w kuwecie 1,00 cm)	0.02
przy 200 nm	0.006
przy 220 nm	< 0.002
przy 254 nm	< 0.002
przy 280 nm	189 nm
Zanik przezroczystości w UV	
Fluorescencja zanieczyszczeń śladowych, mierzona jako zasada chinonowa:	
przy emisji 450 nm	0.02 ppb
przy max. emisji dla zanieczyszczeń rozpuszczalnikowych	0.1 ppb
Kwasy dające się zmierzować (mg/g)	0.0002
Zasady dające się zmierzować (mg/g)	0.00001
Pozostałość po odparowaniu	0.1 ppm
Zawartość wody (oznaczona kulometrycznie)	0.001%
Współczynnik załamania światła, η _D 20/D	1.344
Test elucji gradientowej (a.u.)	
przy 210 nm	0.0005
przy 254 nm	< 0.001
Dane fizykochemiczne:	
Wartość elucyjowa (na Al ₂ O ₃)	0.65
Gęstość (g/ml) w 20°C	0.786
Poślizgłość (1)	6.2
Grupa rozpuszczalnikowa (1)	6
Poślizgłość (1)	
Grupa rozpuszczalnikowa (1)	
(1) Snyder, L.R., J. Chromatography, 92, 223-230 (1974)	

Rozpuszczalnik został specjalnie oczyszczony w procesie wielostopowym zawierającym destylację w całkowicie szklanej aparaturze i ultrafiltrację (PPT). Pakowany pod azotem.

Wysoka gwarantowana czystość i świadectwo analizy widniejące na etykiecie każdego opakowania – to podwójny dowód jakości naszego produktu. Stosując rozpuszczalniki do HPLC „Baker Analyzed” – mamy pewność, że wynik analizy próbki będzie prawdziwy, a nie zniekształcony zanieczyszczeniami wprowadzonymi przez użyty rozpuszczalnik. Na tym można polegać! S. WITKO – EUROCOLOR, skr. poczt. 46, 90-980 Łódź-7, Tel./Fax (042) 84 46 09

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

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. 1217
ANNA SZAKIEL
tel. 23-20-46
JOLANTA GRZYBOWSKA
tel. 13-05-15

RECENZENCI ZESZYTU
Referees of this issue
JERZY BAL
(Warszawa)
ANNA BARAŃCZYK-KUŻMA
(Warszawa)
LUCYNA GRĘBECKA
(Warszawa)
WITOLD JACHYMCZYK
(Warszawa)
ANDRZEJ JERZMANOWSKI
(Warszawa)
GRAŻYNA PALAMARCZYK
(Warszawa)
ANNA SZAKIEL
(Warszawa)
JANUSZ SIEDLECKI
(Warszawa)

ADRES REDAKCJI

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

SPIS TREŚCI CONTENTS

- Tadeusz Mann — Wspomnienia**
Tadeusz Mann — Obituary 70
- Sekwencjonowanie przez hybrydyzację — nowa metoda odczytu kodu genetycznego**
Sequencing by hybridization — a new method for genetic code
MICHAŁ JANITZ, MACIEJ KURPISZ 72
- Naprawa DNA w genomie ludzkim**
DNA repair in human genome
MAŁGORZATA WALICKA 77
- Mukowiscydoza — podstawy wprowadzenia somatycznej terapii genowej**
Cystic fibrosis — the principle of somatic gene therapy
JERZY BAL 86
- Niekonwencjonalne strategie ochrony roślin przed infekcjami wirusowymi**
Non-conventional strategies to protect plants against viral infections
DANUTA HULANICKA, ANDRZEJ PAŁUCHA, WŁODZIMIERZ ZAGÓRSKI 91
- Cytoplazmatyczne białka motoryczne**
Cytoplasmic motor proteins
RENATA DĄBROWSKA 96
- Proteoglikany hapanosiarczanowe — i ich rola w organizmie**
Heparan sulphate proteoglycans and their role in the organism
EWA MARIA KOŹMA, KRYSZYNA OLCZYK 106
- Struktura, biosyntezy i funkcja oligosacharydów glikohormonów**
Structures, biosynthesis and function of glycohormones oligosaccharides
IWONA ŻAK, MARIAN DRÓŻDŹ 113
- Udział białek w procesie aklimatyzacji roślin do niskiej temperatury**
Cold-regulated proteins in cold acclimated plants
DANUTA SOLECKA 121

Dnia 27 listopada 1993 roku zmarł w Cambridge profesor Tadeusz Mann, znany i bliski wielu spośród nas, tu w Kraju.

Urodzony 4 grudnia 1908 roku we Lwowie, studiował medycynę w Uniwersytecie Jana Kazimierza. Już jako student został asystentem Jakuba Karola Parnasa. Brał udział w badaniach przemian pośrednich związanych z wymianą reszt fosforanowych między ATP, fosfokreatyną a produktami glikogenolizy mięśniowej i drożdżowej fermentacji cukru. Doktoryzował się w Uniwersytecie Jana Kazimierza w 1935 roku na podstawie pracy: „O zaczynach odszczepiających amoniak w mięśniu szkieletowym”.

Jako stypendysta Fundacji Rockefellera w tym jeszcze roku wyjechał Tadeusz Mann, wraz z żoną Cecylią — też uczennicą profesora Parnasa — do Cambridge w Anglii. Tu, przez prawie dziewięć lat pracował z Dawidem Keilinem, odkrywcą cytochromu, w instytucie biologii i parazytologii, zwanym potocznie Molteno Institute. Pierwsze badania Manna w Cambridge dotyczyły zawierających hem enzymów roślinnych, co dało podstawę do uzyskania przezeń w 1937 roku tytułu doktora filozofii (Ph D). Część wyników z tego zakresu opublikowanych w kraju, zaproszony przez profesora Parnasa, przedstawił w 1939 roku w Wydziale Lekarskim Uniwersytetu Jana Kazimierza, jako swą pracę habilitacyjną. Badania enzymów metalobiałkowych, prowadzone przez Manna i Keilina objęły enzymy roślinne i zwierzęce. W 1937 roku wykryli oni po raz pierwszy w historii enzymologii, że enzym łączy się ze swoim substratem zanim ten ulegnie katalitycznej przemianie.

„W latach wojny, oprócz obowiązków w Molteno Institute i uczestnictwie w Home Guard (w randze kaprala!), wiele czasu spędzałem w Londynie jako członek międzysojuszniczego komitetu przygotowującego dostawy żywności i innych artykułów pierwszej potrzeby dla krajów wyzwolonych, International Committee for Post-War Requirements” — napisał Mann w swej autobiografii.

Pod koniec wojny, z inicjatywy brytyjskiej rady do badań w zakresie nauk rolniczych, podjął Tadeusz Mann badania nad biochemią nasienia zwierząt domowych, a z czasem stał się rzeczywistym twórcą tej dziedziny biochemii. Na początku lat pięćdziesiątych powierzono Mu w Cambridge kierownictwo oddziału fizjologii i biochemii rozrodu z tytułem University Reader in Physiology of Animal Reproduction (1953-1967). Później został wykładowcą z tytułem Professor of Physiology of Reproduction (1967-1976). Po przejściu na emeryturę w 1976 roku wyjechał do U.S.A. zaproszony jako visiting professor przez N.I.H., co pozwoliło mu na pracę doświadczalną przez dalsze pięć lat.

Niedługo po przyjeździe do Cambridge napisał Tadeusz Mann kilka rozdziałów do dwutomowej biochemii Jakuba Karola Parnasa. Książka ta pt.: „Chemia Fizjologiczna — podręcznik dla lekarzy i studentów medycyny, biologów, chemików i farmaceutów” ukazała się w Warszawie w 1937 r. Swą pierwszą książkę pt.: „Biochemistry of Semen” opublikował Mann w 1954 roku. Przetłumaczono ją wkrótce na języki francuski, japoński i polski. W 1964 r. ukazało się Jego dzieło pt. „Biochemistry of Semen of the Male Reproductive Tract”; kolejne w 1981 r., opracowane wspólnie z żoną, pt. „Male Reproductive Function and Semen — Themes and Trends in Physiology, Biochemistry and Investigative Andrology”. Analogiczne procesy u wielu różnych zwierząt bezkręgowych opisał Profesor w wydanej 1984 roku książce pt.: „Spermatophores — Development, Structure, Biochemical, Attributes and Role in the Transfer of Spermatozoa”. Prac naukowych opublikował blisko trzy-
sta.

W latach pięćdziesiątych przyznano Tadeuszowi Mannowi tytuł doktora nauk (ScD), wybrano członkiem Królewskiego Towarzystwa nauk (F.R.S.); w 1962 nadano Mu tytuł komandora orderu brytyjskiego imperium (O.B.E.). Spośród licznych doktoratów honorowych jakie otrzymał szczególnie cenił sobie doktorat honoris causa Akademii Rolniczej im. Hugona Kołłątaja w Krakowie oraz członkostwo zagraniczne PAN.

W post scriptum do swej autobiografii profesor Mann napisał: „Chociaż większą część badań doświadczalnych wykonałem poza granicami Kraju, moje zamiłowania dotyczyły często zagadnień naukowych, które w przeszłości opracowywali fizjologowie i biochemicy polscy, m.in. ludzie tej miary co Nencki i Marchlewski (biochemia barwików metalo-porfirynowych), Raciborski i Korczewski (fizjologia roślin), Godlewski i Prawocheński (fizjologia procesów rozrodczych u zwierząt (...)).

Mam nadzieję, że w moich wspomnieniach i refleksjach zdołałem przynajmniej w części odzwierciedlić serdeczne uczucia dla przyjaciół w kraju zwłaszcza tych w Akademii w Krakowie. (...) Pełni uczuć nie będąc w stanie ująć w słowa własne, zakończę lepiej słowami Kasprowicza:

«Tą samą chodzę drogą,
Ścieżkami temi samemi,
Lata mnie spędzić nie mogą
Z mej udeptanej ziemi.
Rzadko na moich wargach
Niech dziś to warga ma wyzna
Jawi się krwią przepojony
Najdroższy wyraz: Ojczyzna.»

*Opracowano na podstawie autobiografii
Profesora Tadeusza Manna
sygnowanej 11 marca 1988 r.*

Addendum

Profesora Tadeusza Manna poznałam wiosną 1959 r. w Cambridge, dokąd przyjechałam na krótki staż w Strangeways Research Laboratory. Był to mój pierwszy pobyt w Anglii, pierwszy też kontakt z Anglikami. Profesor spotkał mnie na stacji, zakwaterował i wprowadził do Laboratorium. Państwo Mannowie pokazali mi Cambridge i swe laboratoria, udzielili wielu pożytecznych rad. Na przykład o pewnych obyczajach angielskiego *savoir vivre*, tak wówczas różnych od naszych.

Po wieloletniej przerwie w lecie 1992 roku nawiązałam ponownie kontakt z Profesorem. W ciągu kilkunastu miesięcy dostałam kilkanaście listów i parę książek. Korespondencja rozwinęła się przy okazji zbierania materiałów o profesorze J. K. Parnasie przeznaczonych do publikacji w kwartalniku *Postępy Biochemii*. Profesor Mann przekazał wówczas na moje imię oprawny tom prac z zakładu profesora Parnasa opublikowanych w latach 1928-1938. Przesłał także wspomnienia o swym pierwszym Nauczycielu¹, które jako „Słowo z Cambridge” rozpoczęło serię innych wypowiedzi. Przyjął je z gorącym zainteresowaniem — czytał już ich wstępne wydruki — przyniosły Mu bowiem wiele dotąd nieznanymi informacjami o losach profesora Parnasa.

Swoją autobiografię przysłał mi Pan Tadeusz już w lecie 1992, w listach mówił także trochę o sobie. Na

przykład o zrealizowanym w grudniu 1992 r. wyjeździe do Niemiec, Szwajcarii i Austrii. Z Wiednia — dokąd przybył, by jak w poprzednich latach słuchać słynnych koncertów sylwestrowych symfoników wiedeńskich — przysłał kartę noworoczną. Po powrocie, pisał o pracy nad drugim wydaniem swej książki na temat spermatoforów. I dodał: pod koniec listu: „zarówno umysłowo, jak i fizycznie czuję się niezłe”. Wiosną o samopoczuciu w listach nie było mowy. W przedostatnim liście z końca lipca Profesor raz jeszcze wspomniął osobę Parnasa, dla którego „do dziś — jak napisał — zachowałem ogromny podziw i szacunek”; opowiedział też o swej opiece w Cambridge nad muzyczną młodzieżą uniwersytecką. Właśnie wtedy organizował wyjazd studenckiego chóru Trinity Hall do Polski. Kończąc list dodał: „Naturalnie sam nie będę mógł im towarzyszyć”: Nie byłoby to dziwne: był ich opiekunem, sam zaś grywał na skrzypcach.

O swej chorobie powiadomił mnie pan Tadeusz w końcu października. W parę dni później, z datą 30 października 1993 i dedykacją, przesłał książkę pt. „Dynamic Science — Biochemistry in Cambridge 1899-1949”. Było to podziękowanie za otrzymany tom pt. „Lwowskie środowisko naukowe w latach 1939-1949”, zawierający też komplet podstawowych materiałów o J. K. Parnasie (1894-1949).

Na początku listopada 1993 r. wspólni znajomi z Anglii informowali mnie, że Profesor ma pełną świadomość tego co się z Nim dzieje, nie je, słabnie, ale co dzień jeździ „na spacer” taksówką. Odwiedzają Go i pomagają Mu bliscy i serdeczni. Jeszcze 26 listopada dopisywał coś w swej autobiografii. Zmarł nazajutrz, nad ranem. Przesłano mi wycięty z gazety wydawanej w Anglii nekrolog, kończący się słowami: „O odejściu z tego świata przezacnego i niestrudzonego Człowieka-Naukowca zawiadamiają z głębokim żalem Rodzina oraz Krewni i Przyjaciele w Anglii, w Niemczech, w Polsce, w Kanadzie i w USA”.

Zofia Zielińska

Do członków Polskiego Towarzystwa Biochemicznego

Zarząd P.T.Bioch. uprzejmie prosi wszystkich członków o wpłatę zaległych i bieżących składek członkowskich.

Jednocześnie informujemy, że w dniu 14 września 1993 roku, na zebraniu Zarządu Głównego Polskiego Towarzystwa Biochemicznego ustalono podwyższenie od roku 1994 rocznej opłaty składek członkowskich do sumy 100 000 zł. Natomiast koledzy będący członkami PTBioch status studenta winni wносить roczną opłatę w wysokości 50 000 zł.

Zachęcamy także do zaprenumerowania „Postępów Biochemii”.

Sekwencjonowanie przez hybrydyzację — nowa metoda odczytu kodu genetycznego

Sequencing by hybridization — a new method for genetic code reading

MICHAŁ JANITZ¹,
MACIEJ KURPISZ²

Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Sekwencjonowanie przez hybrydyzację
 - II-1. Oligosondy
 - II-2. Biblioteki DNA
 - II-3. Technika *dot-blot*
 - II-4. Warunki hybrydyzacji
 - II-5. Odczyt sygnału
 - II-6. Interpretacja sygnału
 - II-7. Automatyzacja techniki SBH
- III. Perspektywy

Wykaz stosowanych skrótów: pz — para zasad; SBH — sekwencjonowanie przez hybrydyzację; 6xSSC — 0.9 M NaCl, 90 mM cytrynian sodu; YAC — sztuczny chromosom drożdży; PCR — łańcuchowa reakcja polimerazowa pozwalająca na amplifikację wybranego fragmentu DNA przy użyciu specyficznych sekwencji starterowych; technika *dot-blot* — przeniesienie próbki DNA na filtr w warunkach wywołanego podciśnienia.

I. Wstęp

Powstanie projektu sekwencjonowania ludzkiego genomu (ang. *Human Genome Project*) spowodowało ogromny wzrost zainteresowania metodami sekwencjonowania DNA. Autorzy programu sądzą, iż w oparciu o klasyczne metody sekwencjonowania pełny zapis nukleotydowy ludzkiego genomu, liczącego 3×10^9 pz i zawierającego od 50 do 100 tysięcy genów, będzie poznany w ciągu najbliższych 15 lat kosztem ok. 600 mln dolarów [1-3].

¹ Lek. med., ² doc. dr hab. Zakład Genetyki Człowieka PAN, ul. Strzeszyńska 32, 60-479 Poznań

Contents:

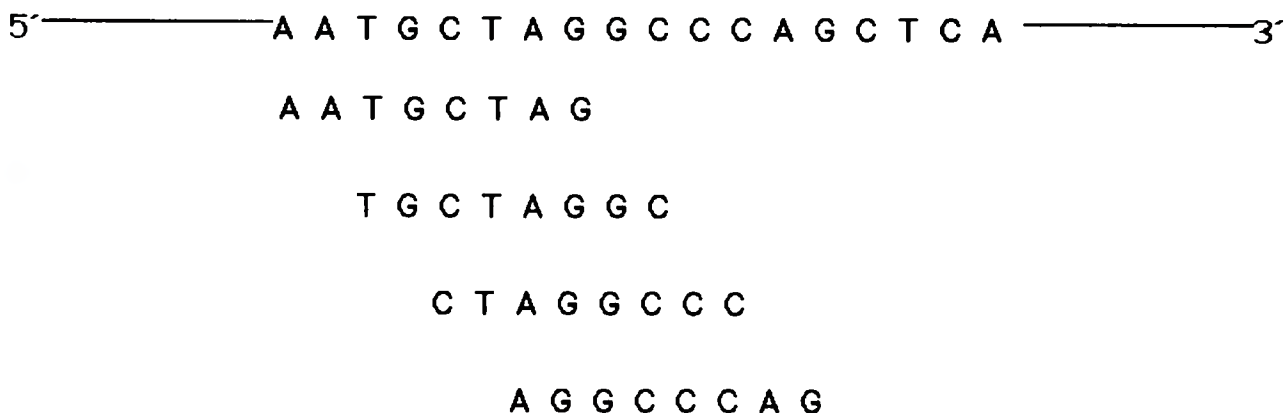
- I. Introduction
- II. Sequencing by hybridization
 - II-1. Oligoprobes
 - II-2. DNA libraries
 - II-3. Dot-blot technique
 - II-4. Hybridization conditions
 - II-5. Signal reading
 - II-6. Signal interpretation
 - II-7. Automation of SBH method
- III. Perspectives

Tradycyjne metody sekwencjonowania DNA opierają się na odczytywaniu kolejności nukleotydów terminujących fragmenty DNA rozdzielone elektroforetycznie, z których każdy następny jest dłuższy od poprzedniego o jedną parę zasad. Różnice pomiędzy poszczególnymi technikami polegają na sposobie otrzymywania fragmentów DNA o różnej długości (i. metoda chemiczna Maxama i Gilberta [4], ii. metoda enzymatyczna Sangera [5]). Inne różnice dotyczą metod znakowania rozdzielonych odcinków DNA. Wykorzystuje się tu znakowanie radioizotopem [6], związkami chemiluminescencyjnymi [7] lub fluorescencyjnymi [8].

Mimo znaczących postępów związanych ze zwiększeniem rozdzielczości elektroforezy (do 1000 pz w pojedynczym rozdziale elektroforetycznym) [9, 10], automatyzacją procesu odczytu sekwencji [11, 12] oraz konstrukcją sekwencjonatorów DNA [8, 13, 14], wielu naukowców uważa, że tempo sekwencjonowania ludzkiego genomu (10^4 pz dziennie przez jeden zespół) należy zwiększyć stukrotnie, przy jednoczesnym obniżeniu kosztów. Naturalną więc konsekwencją stało się poszukiwanie nowych metod sekwencjonowania DNA, wśród których technika sekwencjonowania przez hybrydyzację (SBH — *sequencing by hybridization*) wydaje się najbardziej obiecująca.

II. Sekwencjonowanie przez hybrydyzację

Metoda sekwencjonowania przez hybrydyzację (SBH) [15, 16] opiera się na założeniu, że każda linearna sekwencja DNA jest szeregiem nakładających się, krótkich podsekwencji. Stąd też przy wystarczającej liczbie oligonukleotydów stanowiących sondy hybrydazyjne można określić kolejność nukleotydów w badanym fragmencie DNA (Ryc. 1).



Ryc. 1. Zasada sekwencjonowania przez hybrydyzację (SBH) — każdy fragment DNA jest zbiorem nakładających się podsekwencji.

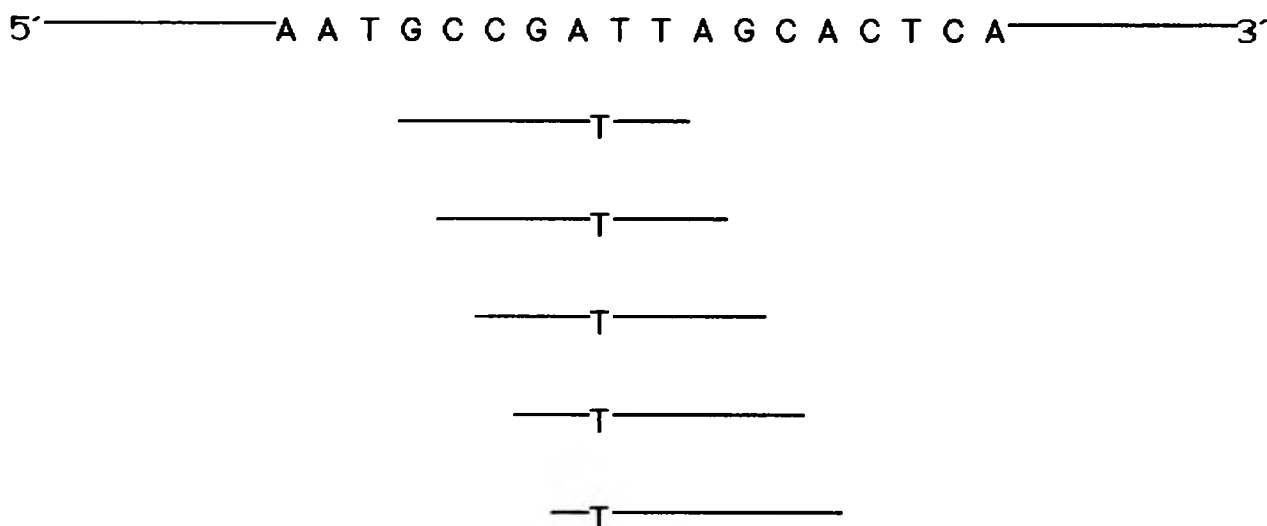
II-1. Oligosondy

Stosując metodę sekwencjonowania przez hybrydyzację (SBH), jako sondy wykorzystuje się najczęściej oktanukleotydy. W użyciu pozostają także sondy 7, 9 i 10 nukleotydowe. W porównaniu z innymi metodami hybrydyzacji (średnia długość sond od stu do kilku tysięcy pz) sondy stosowane w SBH są niezwykle krótkie. Ma to swoje rzeczowe uzasadnienie, bowiem stabilność w pełni komplementarnego kompleksu sonda-badany DNA wzrasta wraz ze spadkiem długości sondy [17]. Teoretycznie każda z możliwych 8-nukleotydowych sekwencji, w liczbie 65 536, może być zastosowana jako sonda hybrydazyjna. Zależy to od

nej sekwencji nukleotydowej [18]. Wynika to z faktu, że do wskazania określonej pozycji pojedynczej pary zasad niezbędne jest uzyskanie sygnału hybrydazyjnego przy użyciu 5 lub więcej sond, których sekwencje wzajemnie się nakładają (Ryc. 2). Oligosondy znakowane są [γ - ^{32}P]ATP na końcu 5' przy użyciu kinazy polinukleotydowej [19].

II-2. Biblioteki DNA

Jedną ze strategii sekwencjonowania DNA jest analiza sekwencji bibliotek DNA lub cDNA. W pierwszym przypadku przed procesem sekwencjonowania genomowy DNA zostaje poddany trawieniu przez



Ryc. 2. Ustalenie pozycji danego nukleotydu w łańcuchu DNA wymaga hybrydyzacji z zastosowaniem przynajmniej 5 oligosond o nakładającej się sekwencji.

enzymy restrykcyjne, a powstałe fragmenty wbudowuje się do wektorów w celu amplifikacji. W zależności od długości wbudowanego fragmentu stosuje się: fagi λ (odcinki 100-20 000 pz) [20], fagi M13 (1000-5000 pz) [21], kosmidy (30 000-45 000 pz) [22], fagi P1 (50 000-100 000 pz) [23] lub sztuczne chromosomy drożdżowe (YAC-*yeast artificial chromosome*), w których długość insertu waha się w granicach 10^5 - 10^6 pz [24]. Sklonowane fragmenty w odpowiednich komórkach gospodarza (bakterie, drożdże) tworzą bibliotekę genomowego DNA.

Inną możliwość stanowi konstrukcja bibliotek cDNA obejmujących sekwencje kodujące w genomowym DNA. Przedmiotem klonowania jest DNA (cDNA) syntetyzowany na matrycy mRNA przy użyciu odwrotnej transkryptazy. Ponieważ aktywność transkrypcyjna genomowego DNA różni się w poszczególnych tkankach organizmu, daje to możliwość tworzenia bibliotek cDNA tkankowo specyficznych. Biblioteki cDNA nie pozwalają jednak na analizę sekwencji niekodujących znajdujących się zarówno w strukturze genów (introny, sekwencje promotorowe), jak i w ich otoczeniu (np. wzmacniacze transkrypcji).

Wybór odpowiedniej biblioteki (genomowego DNA lub cDNA) zależy więc od celu jaki chcemy osiągnąć za pomocą analizy sekwencyjnej.

II-3. Technika *dot-blot*

Uzyskane klony genomowego DNA lub cDNA (najczęściej w fagu M13 jako wektorze) służą jako matryca w procesie hybrydyzacji. Zaproponowano dwa zasadnicze sposoby hybrydyzacji oligosond z DNA (Ryc. 3):

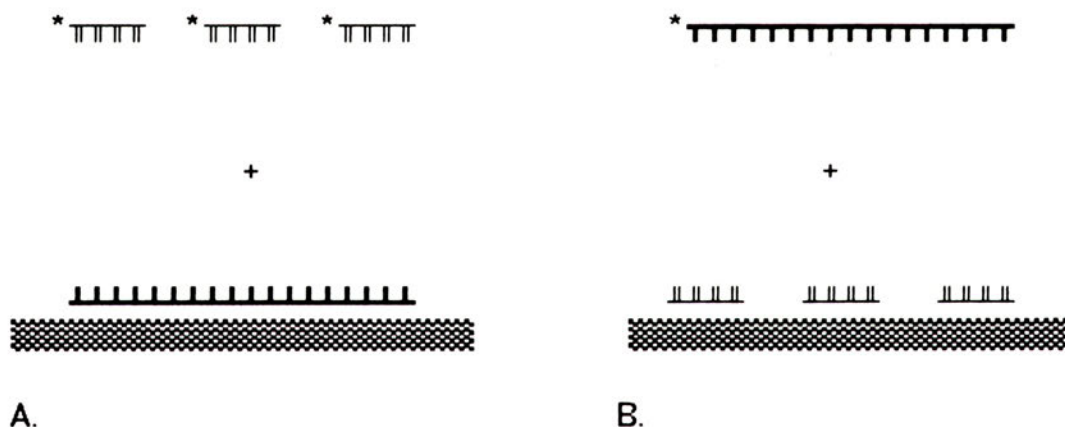
(1) Łańcuch badanego DNA jest immobilizowany w fazie stałej, a następnie hybrydyzowany ze znakowaną radioizotopem oligosondą [16];

(2) Analizowany DNA znakuje się izotopem, po czym hybryduje z szeregiem oligosond przytwierdzonych do podłoża [25, 26];

Ponieważ wariant pierwszy jest częściej stosowany, zostanie on bliżej przedstawiony.

W pierwszym etapie techniki SBH, DNA przenosi się na filtr nylonowy metodą *dot-blot* [27]. Rozpuszczony w buforze alkalicznym DNA (zdenaturowany wektor + insert) jest osadzony na filtrze przy zastosowaniu niewielkiego podciśnienia (ang. *vacuum transfer*). Przy wysokim pH środowiska, cząsteczki DNA ulegają kowalencyjnemu związaniu z filtrem, co ułatwia denaturację DNA. Opisana metoda pozwala przenieść wiele próbek DNA na filtr w stosunkowo krótkim czasie.

Inne techniki transferu DNA (*Southern blot*) lub



- badany fragment DNA
- oligosonda
- oligosonda znakowana izotopem
- znakowany izotopem badany odcinek DNA
- filtr

Ryc. 3. Rodzaje układów hybrydacyjnych: A — badany fragment DNA wiązany jest kowalencyjnie z filtrem, a następnie hybrydyzowany ze znakowaną oligosondą; B — znakowany odcinek DNA jest hybrydyzowany z szeregiem oligosond unieruchomionych na filtrze.

RNA (*Northern blot*) obejmują elektroforezę kwasów nukleinowych przed przeniesieniem na filtr. Elektroforeza dostarcza informacji na temat długości badanego odcinka, ale jednocześnie wydłuża czas procedury i ogranicza liczbę próbek na filtrze. Wydajność metody *dot-blot* zwiększa użycie specjalnych aparatów (np. Bio-Dot SF firmy Bio-Rad lub Minifold II firmy Schleicher and Schuell) lub robotów zdolnych do umieszczenia nawet 36 000 próbek DNA na filtrze o wymiarach 22 na 22 cm.

II-4. Warunki hybrydyzacji

Technika sekwencjonowania przez hybrydyzację wymaga dość specyficznych warunków hybrydyzacji badanego DNA ze znakowaną sondą, m.in. ze względu na małą długość sond. Czas hybrydyzacji wynosi ok. 3 h w temperaturze 12°C. Dla porównania, czas hybrydyzacji wyznaczony metodą klasyczną wynosi kilka do kilkunastu godzin, a temperatura hybrydyzacji utrzymywana jest w przedziale od 42 do 68°C w zależności od obecności lub braku formamidu w płynie hybrydyzacyjnym [29].

Kolejny etap, płukanie filtra, jest niezmiernie istotny dla oceny sygnału, gdyż pozwala zarówno na usunięcie sondy niespecyficznie związanej z filtrem jak i na rozerwanie kompleksów hybrydyzacyjnych o niepełnej komplementarności. Jest to szczególnie ważne, gdy sekwencjonuje się fragmenty DNA o wysokim stopniu homologii. W zależności od długości oligosondy i jej składu nukleotydowego (liczba par GC) płukanie przeprowadza się w określonych warunkach temperatury i czasu [30]. Stosując metodę SBH, ze względu na dużą liczbę stosowanych sond przeprowadza się rutynowo wielokrotne cykle dehybrydyzacji i hybrydyzacji pojedynczego filtra z kolejną sondą (w przypadku filtra nylonowego do 12 cykli). W procesie dehybrydyzacji wykorzystywany jest fakt, że siła wiązania badanego DNA z filtrem (wiązanie kowalencyjne) jest większa niż DNA z oligosondą (wiązanie wodorowe). Intensywność przeprowadzanej dehybrydyzacji (spadek siły jonowej roztworu dehybrydyzacyjnego) jest wprost proporcjonalna do długości kompleksu hybrydyzacyjnego i zawartości par GC w tym kompleksie [31].

II-5. Odczyt sygnału

Ponieważ sondy znakowane są radioizotopem, miarą efektywności hybrydyzacji jest ilość promieniowania emitowana z filtra w miejscach wytworzenia kompleksu hybrydyzacyjnego. Według tradycyjnych metod sekwencjonowania najczęściej do odczytu sygnału stosowane są klisze rentgenowskie, które nałożone na filtr ulegają zaczernieniu w miejscach hybrydyzacji. Zaczernienia mają postać prążków w przypadku technik opartych na rozdziale elektroforetycznym, lub plamek w przypadku użycia techniki *dot-blot*. Ekspozycja filtra odbywa się w temperaturze -80°C,

przez 4-48 godz. Przy sekwencjonowaniu przez hybrydyzację stosuje się urządzenie wzmacniające promieniowanie (ang. *Phosphor-Imager*), używane również w klasycznej autoradiografii. Filtr umieszczony jest w specjalnej kasecie zawierającej ekran pokryty europem. Promieniowanie emitowane z poszczególnych kropek na filtrze wzbudza promieniowanie wtórne na ekranie ograniczone do rozmiarów kropek. Po czasie ekspozycji kilkakrotnie krótszym w porównaniu z klasyczną autoradiografią, sygnał odczytuje się przy użyciu wiązki laserowej sterowanej komputerem. Miejsca wzbudzenia przedstawione są na monitorze komputera w postaci zaczernień. Możliwa jest zarówno ocena ilościowa tła jak i stopnia zaczernienia poszczególnych plam. Przy ustalonym standardzie, pozwala to na precyzyjne oszacowanie komplementarności sondy w stosunku do badanej sekwencji oraz efektywności hybrydyzacji przy różnych stężeniach DNA. Po pomiarze sygnału, ekran po krótkiej ekspozycji na światło dzienne, gotowy jest do ponownego użycia [32].

II-6. Interpretacja sygnału

Podstawowym elementem w ocenie sygnału jest ustalenie przy jakiej wartości sygnału hybrydyzację można uznać za pozytywną bądź negatywną. W tym celu, na każdy filtr oprócz DNA o nieznannej sekwencji nakładany jest kontrolny DNA w szeregu rozcieńczeń (np. DNA faga M13 z insertem o znanej sekwencji) całkowicie lub częściowo komplementarny wobec każdej oligosondy stosowanej w danej serii hybrydyzacji. Stosunek intensywności sygnału hybrydyzacji sondy z kontrolnym DNA o pełnej komplementarności (kontrola pozytywna) i niepełnej komplementarności (kontrola negatywna) wyznacza współczynnik pozytywnego sygnału dla określonej oligosondy. W prawidłowo dobranych warunkach hybrydyzacji powinien on wynosić 10 [33].

Pomimo dobrania optymalnych warunków hybrydyzacji w przypadku każdej sondy notuje się 2-5% fałszywie pozytywnych i negatywnych sygnałów. Fałszywie pozytywny wynik spowodowany jest najczęściej brakiem komplementarności pojedynczych nukleotydów między sondą a DNA. Fałszywie negatywny wynik spotyka się podczas analizy sekwencji końca 5', gdzie drugo- i trzeciorzędowa struktura DNA powodują destabilizację kompleksu hybrydyzacyjnego (ang. *SBH compression*) [34]. W celu wzmocnienia sygnału stosuje się dłuższe sondy (do 12 pz) i łagodniejsze warunki płukania (np. 5 min. w 0°C).

II-7. Automatyzacja techniki SBH

Ze względu na ogromną liczbę stosowanych sond i konieczności interpretacji wyników setek hybrydyzacji na pojedynczym filtrze, opracowano dla potrzeb SBH specjalne programy komputerowe pozwalające na odtworzenie badanej sekwencji na podstawie pozy-

tywnych sygnałów z oligosondami o nakładającej się sekwencji. Stosując odpowiednie testy symulacyjne wykazano, iż nawet 10% błędów w odczycie nie ma wpływu na ostateczne ustalenie sekwencji [35]. Oprócz ustalonych programów, na zmniejszenie pracochłonności i obniżenie kosztów stosowania metody SBH miała wpływ automatyzacja procesu transferu klonów z kolonii bakteryjnych [36], zastosowanie metody PCR w celu amplifikacji sklonowanych fragmentów DNA oraz konstrukcja robotów laboratoryjnych wykorzystywanych w technice *dot-blot* do przenoszenia poszczególnych klonów na filtr [28].

III. Perspektywy

Mimo wielu technicznych odrębności, sekwencjonowanie poprzez hybrydyzację może stać się ważnym elementem uzupełniającym tradycyjne metody sekwencjonowania. Przykładem tego może być koncepcja wstępnej charakteryzacji nieznaną sekwencji przy użyciu SBH (ang. *partial SBH*) [37], a następnie całkowite sekwencjonowanie danego klonu w oparciu o metody klasyczne. Taka strategia może być szczególnie przydatna przy badaniu bibliotek cDNA. Stosując 30 do 100 razy mniej oligosond w porównaniu z liczbą potrzebną do całkowitego zsekwencjonowania można wstępnie określić przynależność danego klonu do określonej rodziny genów. Znając sekwencję jednego z alleli genu można opracować zestaw sond zdolny wykryć sekwencje homologiczne w poszczególnych tkankach lub blisko spokrewnionych organizmach. W wyniku częściowego SBH, klony cDNA byłyby opatrzone wizytówką pozwalającą na uporządkowanie sekwencji w ramach bibliotek cDNA [38].

Kolejną perspektywę stanowi miniaturyzacja procesu hybrydyzacji. We wstępnych badaniach znajdują się mikrofiltry (tzw. *sequencing chips*), na których w odległościach rzędu mikrometrów znajdują się miliony oligosond o różnej sekwencji. Mikrofiltry hybrydują się z mieszaniną znakowanych fluorescencyjnie, krótkich fragmentów genomowego DNA lub cDNA (patrz podrozdz. II-3.), a następnie odczytuje się sygnał przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego [39].

Biorąc pod uwagę dynamiczny rozwój sekwencjonowania przez hybrydyzację należy się spodziewać, że w stosunkowo krótkim czasie znajdzie ona wiele zastosowań w procesie sekwencjonowania kwasów nukleinowych.

*Artykuł otrzymano 7 października 1993 r.
Zaakceptowano do druku 4 lutego 1994 r.*

Piśmiennictwo

1. Roberts L (1990) *Science* **249**: 1497
2. Roberts L (1987) *Science* **237**: 1411-1412
3. Lewin R (1986) *Science* **232**: 1598-1600
4. Maxam AM, Gilbert W (1977) *Proc Natl Acad Sci USA* **74**: 560-564

5. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) *Proc Natl Acad Sci USA* **74**: 5463-5467
6. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York
7. Tizard R, Cate RL, Ramachandran KL, Wysk M, Voyta JC, Murphy OJ, Bronstein I (1990) *Proc Natl Acad Sci USA* **87**: 4514-4518
8. Prober JM, Trainor GL, Dam RJ, Hobbs FW, Robertson CW, Zagursky RJ, Cocuzza AJ, Jensen MA, Baumeister K (1987) *Science* **238**: 336-341
9. Swerdlow H, Gesteland R (1990) *Nucleic Acids Res* **18**: 1415-1419
10. Luckey JA, Drossman H, Kostichka AJ, Mead DA, D'Cunha J, Norris TB, Smith LM (1990) *Nucleic Acids Res* **18**: 4417-4421
11. Elder JK, Green DK, Southern EM (1986) *Mol Biol Rep* **14**: 417-424
12. West J (1987) *Mol Biol Rep* **1**: 1-3
13. Ansorge W, Sproat B, Stegemann J, Schwager C, Zenke M (1987) *Nucleic Acids Res* **15**: 4593-4602
14. Connell C, Fung S, Heiner C, Bridgham J, Chakerian V, Heron E, Jones B, Menchen S, Moridan W, Raff M, Recknor M, Smith L, Springer J, Woo S, Hunkapiller M (1987) *Bio Techniques* **5**: 342-348
15. Drmanac R, Crkvenjakov R (1987) *Yugoslav Patent Appl* 570
16. Drmanac R, Labat I, Brukner I, Crkvenjakov R (1989) *Genomics* **4**: 114-128
17. Drmanac R, Strezoska Z, Labat I, Drmanac S, Crkvenjakov R (1990) *DNA Cell Biol* **9**: 527-534
18. Lehrach H (1991) W: Davies KE, Tilghman SM (red) *Genome Analysis, Genetic and Physical Mapping*, t 2, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, str 39-81
19. *Promega Protocols and Application Guide* (1991) Titus ET (red) Promega Corporation, USA, str 150-152
20. Murray NE (1983) W: Hendrix RW, Roberts J, Stahl F, Weisberg R (red) *Lambda II*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, str 395-432
21. Messing J, Gronenborn B, Muller-Hill B, Hofschneider PH (1977) *Proc Natl Acad Sci USA* **74**: 3642-3646
22. Ish-Horowitz D, Burke JF (1981) *Nucleic Acids Res* **9**: 2989-2998
23. Sternberg N (1990) *Proc Natl Acad Sci USA* **87**: 103-107
24. Burke DT, Carle GF, Olson MV (1987) *Science* **236**: 806-812
25. Bains W, Smith GC (1988) *J Theor Biol* **135**: 303-307
26. Khrapko KR, Lysov YP, Khorlyn AA, Shick VV, Florentiev VL, Mirzabekov AD (1989) *FEBS Lett* **256**: 118-122
27. Brown T (1993) W: Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K (red) *Current Protocols in Molecular Biology* t 1, Greene Publishing Associates, John Wiley & Sons, Inc, Kanada, str 2.9.15-2.9.20
28. Meier-Ewert S, Maier E, Ahmadi A, Curtis J, Lehrach H (1993) *Nature (Lond)* **361**: 375-376
29. Southern EM (1975) *J Mol Biol* **98**: 503-517
30. Drmanac R, Drmanac S, Strezoska Z, Paunesku T, Labat I, Zeremski M, Snoddy J, Funkhouser WK, Koop B, Hood L, Crkvenjakov R (1993) *Science* **260**: 1649-1652
31. Brown T (1993) W: Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K (red) *Current Protocols in Molecular Biology* t 1, Greene Publishing Associates, John Wiley & Sons, Inc, Kanada, str 2.10.6-2.10.8
32. *Materiały informacyjne firmy Molecular Dynamics*, Sunnyvale, California, USA
33. Strezoska Z, Paunesku T, Radosavljevic D, Labat I, Drmanac R, Crkvenjakov R (1991) *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 10089-10093
34. Paunesku T, Crkvenjakov R, wyniki nieopublikowane
35. Drmanac R, Labat I, Crkvenjakov R (1991) *J Biomol Struct Dyn* **8**: 1085-1102
36. Jones P, Watson A, Davies M, Stubbings S (1992)

Naprawa DNA w genomie ludzkim

DNA repair in human genome

MAŁGORZATA WALICKA*

Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Mechanizmy naprawy
- III. Choroby dziedziczne z upośledzoną naprawą
- IV. Heterogenność naprawy w genomie. Naprawa genowa
- V. Genetyczna kontrola naprawy

Contents:

- I. Introduction
- II. Repair mechanisms
- III. Human diseases associated with defective repair
- IV. Genomic heterogeneity of repair. Gene repair
- V. Genetic control of repair

Wykaz stosowanych skrótów: XP — xeroderma pigmentosum; CS — zespół Cockayne'a; TTD — trichotiodystrofia; HSSB — ludzkie białko wiążące jednoniciowy DNA (*human single-stranded binding protein*); PCNA — antygen jądrowy komórek proliferujących (*proliferating cell nuclear antigen*); RF-C — czynnik replikacyjny C (*replication factor C*); DP — (5-5, 6-6) cyklobutanowy dimer pirymidynowy; Foto-produkt 6-4 — fotoprodukt 6,4-tyminy-cytozyny; ERCC — ludzkie geny komplementujące wrażliwe na UV mutanty komórek chomika chińskiego (*excision repair Chinese hamster complementing*); N-AAAF — N-acetoksy-2 acetylo-amino fluoren; AAF — 2-acetylo-aminofluoren; MNU — metylo-nitrozomocznik; DHFR — gen dehydrogenazy dihydrofolianowej; ADA — gen dezaminazy adeniny; TRCF — czynnik sprzężenia naprawy z transkrypcją (*transcription repair coupling factor*); mdf — gen *E. coli* odpowiedzialny za spadek częstości mutacji (*mutation frequency decline*); kz — kilozasada; kDa — kilodalton.

I. Wstęp

Mutageny i kancerogeny środowiskowe, produkty metabolizmu komórkowego np. utleniania, niestabilność chemiczna DNA i spontaniczne błędy w replikacji powodują powstawanie uszkodzeń w genomie. Ich letalne i mutagenne skutki są łagodzone przez enzymatyczne procesy naprawy.

W niniejszym artykule przedstawię obejmującą szerokie spektrum uszkodzeń i najlepiej znaną naprawę przez wycinanie nukleotydu. Nasza wiedza dotyczy

w głównej mierze usuwania dimerów pirymidynowych (DP), indukowanego przez UV. Aby zrozumieć ten proces prowadzi się badania komórek ludzi cierpiących na dziedziczne choroby: *xeroderma pigmentosum* (XP), zespół Cockayne'a (CS) i trichotiodystrofię (TTD). W chorobach tych występuje nadwrażliwość na światło, nowotworzenie i/lub anomalie neurologiczne oraz duże zróżnicowanie fenotypów.

Do przeprowadzenia wstępnego etapu naprawy, tj. rozpoznania uszkodzenia i jego wycięcia, niezbędnych jest więcej niż osiem białek zmienionych w XP [1], w tym endonukleaza wycinająca DP [2]. W etapie replikacji naprawczej, wykonanej przez polimerazy δ i ϵ [3], niezbędne są białka HSSB, PCNA i RF-C [1].

Obecnie umiemy ocenić poziom naprawy nie tylko w całym genomie (*bulk DNA repair*), ale i dowolnej znanej sekwencji DNA. Naprawa genomu jest heterogenna: uszkodzenia genów czynnych, w szczególności nici transkrybowanej, są usuwane szybciej niż uszkodzenia genów nieczynnych. Zjawisko to obejmuje się mianem naprawy preferencyjnej (*preferential repair*) [4].

Spośród dziesiątków genów, od których zależy przebieg naprawy w komórkach zwierzęcych, sklonowano ponad dwadzieścia [3]. Sześć z nich: ERCC1, ERCC2, ERCC3, ERCC5 (XPGc), ERCC6, XPAC [5, 6] są to ludzkie geny mające udział w rozpoznaniu i wycięciu uszkodzenia wywołanego przez UV. Są one zmutowane w XP, CS i TTD, a zatem mogą być pośrednio związane z procesami nowotworzenia i powstawania anomalii neurologicznych. Geny ERCC nie wykazują homologii do genów UvrABC sterujących

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

etapem rozpoznania i nacięcia w komórkach *E. coli*. Wynika to z odmienności substratu dla enzymów naprawczych w komórkach bakteryjnych i zwierzęcych [6, 7]. W tych ostatnich jest nim chromatyna. Natomiast homologia do genów komórek gryzoni, drożdży i muszki owocowej wskazuje na zachowawczy charakter naprawy przez wycinanie u *Eukaryota* [8].

Geny ERCC2, ERCC3 i ERCC6 kodują helikazy RNA i DNA. Świadczy to o istotnej roli helikazy w procesie naprawy [8]. Najważniejszym ostatnim odkryciem jest stwierdzenie przez Schaeffera i w s.p. [9], że helikaza naprawcza ERCC3 stanowi składnik czynnika transkrypcyjnego BTF2 (TFIIH). Należy on do podstawowych czynników transkrypcyjnych inicjujących wraz z polimerazą II RNA większość promotorów i przeprowadzających transkrypcję podstawową. Analiza genu ERCC6 [10] korygującego upośledzenie naprawy preferencyjnej w CS i wykazującego homologię do genów regulatorów transkrypcji u drożdży i muszki owocowej, również wskazuje, że transkrypcja i naprawa przez wycinanie posiadają wspólnie składniki białkowe i są funkcjonalnie połączone [11].

W świetle tych doniesień [9-12] oczywiste staje się, że prawdopodobnie wiele genów uznawanych za geny naprawy DNA pełni w naprawie rolę pośrednią [12]: od kodowanej przez nie aktywności może zależeć transkrypcja, składanie RNA i translacja genów kodujących enzymy naprawcze, zaś w zespołach XP, CS i TTD należy raczej widzieć skutki zaburzonej transkrypcji [13] niż upośledzenia naprawy DNA.

II. Mechanizmy naprawy

Uszkodzenia DNA indukowane przez czynniki fizyczne i chemiczne zostały wyczerpująco przedstawione w [4]. Tutaj pragnę zwrócić uwagę, że w komórkach zwierzęcych rodzaj i zlokalizowanie uszkodzeń zależy nie tylko od sekwencji nukleotydów w nici DNA, lecz od struktury chromatyny [15]. Przedmiotem niniejszego artykułu jest naprawa zmian wywołanych w DNA przez UV. Są to głównie DP i powstające z 5-10 razy mniejszą częstością fotoprodukty 6-4 [16]. Wydajność kwantowa tworzenia DP jest zależna od sekwencji nukleotydów [17]. Znając sekwencje możemy z dużym prawdopodobieństwem podać miejsca mutacji (*mutation hot spots*) w badanym genie, np. [16, 18]. Mimo, że fotoprodukty 6-4 powstają z mniejszą częstością niż DP, we fragmentach DNA w których częstsze są dwójki TC niż TT będą one dominowały [16]. Sekwencja zasad odgrywa również rolę w tworzeniu adduktów przez kancerogeny chemiczne [19, 20]. Addukty kancerogenów chemicznych charakteryzuje ponadto nierównomierny rozkład między DNA rdzenia nukleosomu i DNA łącznikowy: np. przyłączenie metabolitów benzo(a)pyrenu do łącznikowego DNA jest 3-4 razy częstsze niż do rdzenia [21, 22]. Podobna preferencja występuje w przypadku czynników mety-

lujących [23, 24], furokumaryn [25] i N-AAAF [26]. Na wyższym poziomie organizacji chromatyny jej stan funkcjonalny dodatkowo wpływa na dostępność DNA dla czynników geno-toksycznych. Obszary transkrypcyjnie czynne mają bardziej otwartą strukturę niż reszta genomu ponieważ są pozbawione nukleosomów [27]. Powoduje to, że wiele kancerogenów preferencyjnie tworzy addukty w tych obszarach np. AAF N-hydroxy-AAF, dimetylo-N-nitrozoamina, MNU i diol-epoksyd benzo(a)pyrenu [28, 29]. Również promieniowanie jonizujące wytwarza więcej wiązań krzyżowych między białkiem i DNA w chromatynie czynnej w porównaniu z nieczynną [30]. Różnica taka nie występuje w przypadku DP [31].

Dla naprawy uszkodzeń DNA w komórkach ssaków przyjmuje się zmodyfikowane schematy dotyczące komórek bakteryjnych. Skomplikowana organizacja genomu eukariotycznego wymaga jednak specjalnych zmian dopasowujących chromatynę do stanu umożliwiającego usunięcie uszkodzenia DNA. Z tego względu w procesie naprawy bierze udział większa liczba białek, tym samym większa liczba genów determinuje jej przebieg [7].

Analizując procesy naprawy możemy wyodrębnić naprawę bezpośrednią, przez wycinanie (*excision repair*) i postreplikacyjną zwaną też naprawą w nici potomnej (*post-replication, daughter strand repair*) [32]. Ten ostatni typ naprawy ma miejsce po zreplikowaniu uszkodzonego DNA. Replikacja może zachodzić z obejściem uszkodzenia przez polimerazę (*translesion synthesis*), tj. syntezę ciągłej nici potomnej zawierającej błędy, lub z przeskakiwaniem uszkodzenia przez enzym i powstawaniem ubytków (*gaps*) na przeciwko uszkodzenia. Mechanizm wypełniania ubytków w potomnym DNA komórek zwierzęcych jest słabo poznany [33].

Naprawa bezpośrednia, z udziałem jednego enzymu, jest prostym przywróceniem stanu sprzed uszkodzenia. W przypadku DP polega ona na jego rozszczepieniu przez fotoliazę w obecności światła [34]. W przypadku alkilacji, alkilotransferaza DNA przynosi mały podstawnik alkilowy z alkilowanej guaniny na resztę cysteiny w swoim centrum aktywnym, tym samym inaktywując się (artykuł przeglądowy w [35]).

W naprawie przez wycinanie rozpatruje się naprawę przez wycinanie nukleotydu i wycinanie zasady. Absolutne ich rozróżnienie nie zawsze jest możliwe. Naprawa przez wycinanie zasady (*base excision*) usuwa zasady uszkodzone przez promieniowanie jonizujące i monofunkcyjne czynniki alkilujące. W jej pierwszym etapie swoista glikozylaza rozpoznaje i usuwa uszkodzenie poprzez hydrolizę wiązania N-glikozyloвого między uszkodzoną zasadą i deoksyrybozą [36]. Następnie endonukleaza apurynowa lub apirimidynowa nacina wiązania fosforanowe między resztami cukrowymi. Polimeraza DNA, najprawdopodobniej polimeraza β , wypełnia powstałą lukę 2-3 nukleotydową, wykorzystując nić komplementarną jako mat-

rycę, zaś ligaza łączy fosforan deoksyrybozy ze szkieletem DNA [37].

Naprawa przez wycinanie nukleotydu (*nucleotide excision repair*) usuwa duże uszkodzenia. Mechanizm tej naprawy u *E. coli* jest poznany w szczegółach w przypadku usuwania DP, lub innych uszkodzeń powodujących podobne zmiany w dwuniciowej strukturze DNA. DP jest rozpoznawany przez endonukleazę wycinającą UVrABC (*UVrABC excinuclease*). Produkty genów UVrA, UVrB, UVrC działają na wiele typów uszkodzeń [38]. Brak swoistości tych białek wobec uszkodzeń tłumaczy w sposób przekonujący hipoteza [39] według której białko UVrB pełni rolę mierniczego oddziaływań warstwowych między zasadami. W przypadku zaburzenia w tych oddziaływaniach kompleks UVrA₂B nacina nić DNA po obu stronach uszkodzenia, w odległości 6-ciu nukleotydów od strony 5' i 3 od strony 3'. Następnie białko UVrD tj.

helikaza II, polimeraza I i ligaza dokonują dalszych etapów naprawy: odsunięcia oligonukleotydu zawierającego uszkodzenia, poszerzenia luki, polimeryzacji i połączenia fragmentu nowosyntetyzowanego ze starym.

W komórkach zwierzęcych badania nad naturalnymi i indukowanymi mutantami i opracowanie bezkomórkowego układu do odtwarzania naprawy z wykorzystaniem uszkodzonego plazmidu jako substratu [40] pozwoliły na zaproponowanie modelu [1] przedstawionego na rycinie 1.

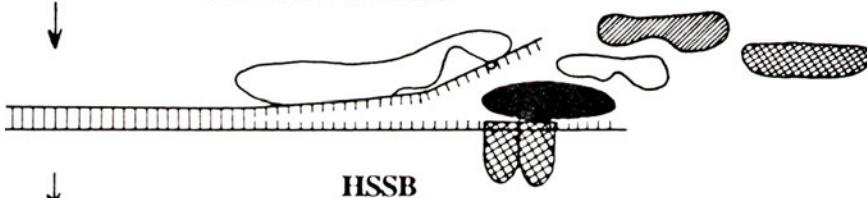
W pierwszym etapie, po rozpoznaniu uszkodzenia, następuje nacięcie nici w 23 lub 21 wiązaniu fosfodiesterowym od strony 5' i 6 lub 5 od strony 3' przez nukleazę nukleotydową wycinającą (*nucleotide excision nuclease*) [2]. Etap ten wymaga skoordynowanego działania ponad ośmiu białek kodowanych przez geny zmutowane w XP i geny ERCC — patrz paragraf V. Stabilne

ETAP I

Rozpoznanie, nacięcie



Odsunięcie wyciętego fragmentu

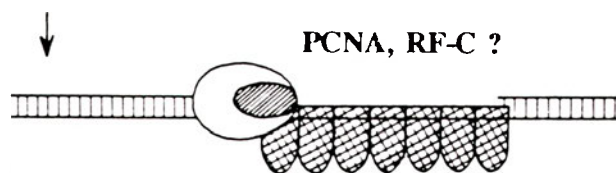


Stabilizacja luki

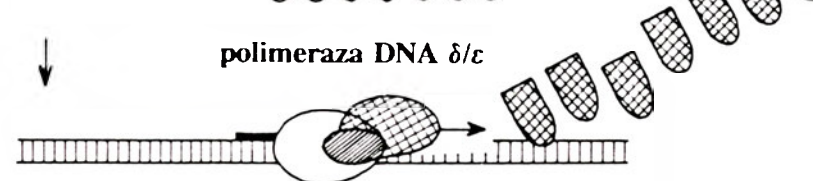


ETAP II

Inicjacja replikacji naprawczej



Replikacja naprawcza



Połączenie zreplikowanego fragmentu ze starą częścią nici



Ryc. 1. Naprawa przez wycinanie nukleotydu w układzie bezkomórkowym. Modyfikacja modelu proponowanego przez Shivji i wsp. [1].

produkty pośrednie powstałe w wyniku nacięcia wykrywa się tylko w obecności białka HSB_B. Shi i vji i wsp. uważają, że białko HSB_B może służyć do ochrony powstałej luki przed degradacją lub obróbką w niepożądanym kierunku, np. rekombinacją. Białko to może również pomagać w odłączeniu uszkodzonego oligonukleotydu od białek rozpoznających i nacinających i w ten sposób umożliwić powtórne ich użycie. Następnym etapem, synteza naprawcza, zachodzi w obecności białka PCNA, które przyłącza się wraz z białkiem RF-C do miejsca związania matrycy z primerem. Syntezy naprawczej dokonuje polimeraza δ lub ϵ [3]. Na koniec ligaza I łączy grupę OH 3' nowosyntetyzowanego fragmentu z końcowym fosforanem 5' starej części nici [37, 41].

Białko HSB_B, polimerazy DNA, białka PCNA i RF-C oraz ligazy działające w drugim etapie naprawy przez wycinanie są niezbędne dla normalnego metabolizmu DNA, to jest dla życia komórki. Dlatego, być może, udaje się tylko izolować mutanty naturalne i indukowane o podwyższonej wrażliwości na promieniowanie UV, które wykazują upośledzenie w etapie naprawy dotyczącym rozpoznania uszkodzenia i nacięcia nici, nie zaś w etapie syntezy naprawczej i ligacji — por. paragraf V.

Warto w tym miejscu wspomnieć, że mutacja w genie ligazy I powoduje wrażliwość na wiele czynników uszkadzających DNA, gdyż enzym ten jest wspólny dla naprawy przez wycinanie zasady i nukleotydu oraz łączy proste pęknięcia szkieletu fosforanowo-cukrowego DNA wywołane przez promieniowanie jonizujące. Mutację w genie ligazy I stwierdzono u pacjentki ze zwiększoną wrażliwością na czynniki środowiskowe, upośledzeniem immunologicznym i domniemanym nowotworzeniem (tzw. komórki 46 BR) [41].

III. Choroby dziedziczne z upośledzoną naprawą

Naturalne mutanty ludzkie, za jakie możemy uważać dziedziczne zespoły chorobowe z nadwrażliwością na czynniki genotoksyczne, stanowią podstawowy materiał w badaniu mechanizmów naprawy w genomie ludzkim. Najpierw wykryto upośledzenie naprawy w XP [42, 43]. W wyniku tego odkrycia zwrócono uwagę na takie zespoły chorobowe jak: zespół Wernera, anemia Falconiego (AF), zespół Blooma, zespół Downa, *ataxia telangiectasia* (AT), zespół Cockayne'a, (CS) actinic keratosis, chroniczna białaczka limfatyczna, porfirie, *epidermodysplasia veruciformis*, progerie i inne. Odnośniki do współczesnych badań znajdzie czytelnik w przeglądzie Lehmana i Karrera [44]. Z czasem ograniczono się głównie do badań nad XP, CS, AT i AF, zaś w latach osiemdziesiątych włączono do tej listy trichotiodystrofię (TTD). Wyczerpujące omówienie badań naprawy DNA w AT i AF przedstawiono w pracy Lehmana i Deana [45]. Molekularne podłoże upośledzenia naprawy

poznano najlepiej w przypadku XP, ZC i TTD i z tego względu konieczne jest skrótove przedstawienie objawów klinicznych i fenotypu komórek XP, ZC i TTD w hodowlach *in vitro*.

XP jest rzadko występującą chorobą, dziedziczną w sposób recesywny, autosomalny. Pacjentów cechuje nadwrażliwość na światło, anomalie barwnikowe i przednowotworowe zmiany w skórze ekspozowanej na światło słoneczne, ponad tysiącrotnie zwiększona częstość występowania nowotworów skóry i oczu, dziesięcio-dwudziestokrotnie zwiększona częstość nowotworzenia w organach innych niż skóra, a w wielu przypadkach postępująca degradacja neurologiczna [43, 46]. Komórki pacjentów XP hodowane *in vitro* są wrażliwe nie tylko na UV lecz również kancerogeny tworzące duże addukty [47]. Defekt polega na upośledzeniu naprawy przez wycinanie nukleotydu. Doświadczenia z fuzją komórkową wykazały, że komórki różnych pacjentów mogą wzajemnie uzupełniać braki w naprawie. Istnieje siedem grup komplementacyjnych oznaczonych od XP-A do XP-G [48-50]. Mikroinjekcje endonukleaz prokariotycznych swoistych dla DP przywracają zdolność do przeprowadzenia naprawy [51]. W nielicznych przypadkach zwanych wariantami XP naprawa przez wycinanie przebiega normalnie, lecz zwiększona wrażliwość na UV i podwyższona częstość mutacji występuje łącznie z defektem w naprawie postreplikacyjnej [52-54].

Pacjenci CS [55] wykazują silny niedorozwój umysłowy i fizyczny, deformacje szkieletu, brak anomalii w ubarwieniu skóry i zmian nowotworowych. Są wrażliwi na światło słoneczne, zaś ich komórki hodowane *in vitro* — na promieniowanie UV. Zidentyfikowano trzy grupy komplementacyjne komórek CS: CS-A, CS-B i CS-C [56]. Komórki CS wykazują normalny poziom naprawy genowej ale są upośledzone w naprawie genów aktywnych transkrypcyjnie [57]. Istnieją pacjenci z klinicznymi cechami XP i CS. W tych przypadkach defekt w naprawie został zaklasyfikowany jako charakterystyczny dla grup komplementacyjnych XP-B, XP-D i XP-G [3].

TTD jest chorobą dziedziczną autosomalną, recesywną charakteryzującą się niedorozwojem umysłowym i fizycznym oraz niedoborem siarki we włosach, co powoduje ich wykruszenie się. Około 20% przypadków cechuje nadwrażliwość na światło, której towarzyszy upośledzenie naprawy DNA [58]. Upośledzenie to wydaje się być identyczne z występującym w XP-D [59]. Ponieważ grupa komplementacyjna XP-D zawiera komórki XP, CS i TTD, Hoeijmakers i Bootsma zaproponowali [5], że locus XP-D może kodować wiele funkcji. Wyjaśniłoby to heterogenność tej grupy komplementacyjnej.

Wśród trzech opisanych naturalnych mutacji ludzkich podwyższone nowotworzenie występuje tylko w XP. Z tego powodu nie można uważać, że nowotworowy fenotyp XP zależy tylko od upośledzenia

naprawy uszkodzeń DNA wywołanych przez czynnik środowiskowy. *Lehman i Norris* [60] zaproponowali wobec stwierdzonego niedoboru przeciwnie, że fenotyp nowotworowy XP jest rezultatem zarówno upośledzenia naprawy DNA jak i upośledzenia nadzoru immunologicznego. Ten ostatni defekt uniemożliwia zapobieganie rozwojowi zmian nowotworowych skóry. Grupa *Sarasin* [61] sugerowała, że nowotworowy fenotyp XP może być związany ze zwiększonym poziomem uszkodzeń oksydacyjnych, gdyż w komórkach XP stwierdzono pięciokrotne zmniejszenie aktywności katalazy. Wobec braku wrażliwości komórek XP na uszkodzenia oksydacyjne [62] należy jednak tę hipotezę odrzucić.

IV. Heterogenność naprawy w genomie. Naprawa genowa

Naprawę w całym genomie (*bulk DNA repair*) poznano w istotnym stopniu dzięki badaniom na komórkach XP, natomiast doświadczenia na komórkach CS zapoczątkowały badania naprawy na poziomie pojedynczego genu. Komórki CS, napromieniowane UV, mimo poziomu naprawy w całym DNA charakterystycznego dla komórek ludzi zdrowych, przejawiają długotrwałe zahamowanie syntezy RNA. Fakt ten skłonił *Mayne i Lehmana* [63] do przypuszczenia, że w zespole Cockayne'a mamy do czynienia z brakiem usuwania uszkodzeń z genów aktywnych. Hipoteza ta potwierdziła się po kilku latach [57, 64, 65].

Geny czynne stanowią jak wiadomo ok. 1% genomu. W komórce zachodzi usuwanie uszkodzeń z genów czynnych, w szczególności z ich transkrybowanych nici, a zatem naprawa preferencyjna. Jej wykrycie było możliwe dzięki zastosowaniu technik biologii molekularnej, tj. cięcia enzymami restrykcyjnymi, hybrydyzacji do dwuniciowych sond DNA (*Southern blotting*) [66], lub w przypadku gdy badamy naprawę w nici transkrybowanej, do jednoniciowych sond RNA [67]. Naprawę preferencyjną wykrył *Bohr* i w s p. [68] w genie DHFR komórek chomika chińskiego. Wkrótce okazało się, że naprawa preferencyjna występuje w komórkach na różnym poziomie organizacji: bakteryjnych [69], drożdżowych [70] oraz ludzkich [67], [71].

Pierwotnie naprawę preferencyjną wiązano ze szczególnymi własnościami strukturalnymi chromatyny aktywnej transkrypcyjnie, z utratą struktury nukleosomowej tj. co ułatwia dostęp enzymów naprawczych do DNA, jak również z jej lokalizacją w pobliżu miejsc przyczepu pętli DNA do *matrix* jądrowej [64, 65]. W miejscach tych lub w ich pobliżu upatruje się funkcjonalne i strukturalne punkty kontroli replikacji i transkrypcji [72]. Warto zauważyć, że obszar naprawy preferencyjnej DNA jest większy niż badany gen. Np. dla genu DHFR o wielkości ~ 30 kZ wynosi on 60-80 kZ [73], co odpowiada średniej wielkości pętli DNA. Zatem pętla DNA mogłaby być również funk-

jonalną i strukturalną jednostką naprawy DNA.

Zaobserwowanie naprawy preferencyjnej w komórkach *E. coli* [69], w których nie ma chromatyny o budowie charakterystycznej dla komórek eukariotycznych oraz brak naprawy preferencyjnej u *Drosophila melanogaster* [74] odwróciły uwagę od uwarunkowań naprawy preferencyjnej związanych ze strukturą aktywnej chromatyny i doprowadziły do hipotezy naprawy sprzężonej z transkrypcją [75]. Według tej koncepcji istotną rolę w naprawie nici transkrybowanej ma pełnić tzw. czynnik sprzężenia naprawy z transkrypcją, TRCF (*transcription repair coupling factor*). *Selby* i w s p. [76] wyizolowali białko TRCF z komórek *E. coli* mfd⁺. W układzie bezkomórkowym białko to stymuluje kilkakrotnie selektywne usuwanie dużych podstawników takich jak DP i monoaddukty psoralenu z transkrybowanej nici genu przepisywanego z dużą częstością [76, 77]. Sprzężenie transkrypcji i naprawy w komórkach zwierzęcych zostanie omówione w paragrafie V.

Istnienie naprawy preferencyjnej wyjaśnia, jak to dowcipnie sformułował *Hanna* w *alt*, "repairadox" komórek gryzoni. Polega on na tym, że komórki te są w takim samym stopniu wrażliwe na UV co komórki ludzkie, zaś naprawa całego DNA komórkowego stanowi 10-20% poziomu obserwowanego w komórkach ludzkich [79, 80]. Komórkom gryzoni wystarcza selektywna naprawa uszkodzeń z transkrybowanej nici genów aktywnych [69], podczas gdy komórki ludzkie usuwają DP zarówno z genów aktywnych jak i z całego genomu [68].

Obecnie dostępne dane sugerują istnienie hierarchii w naprawie genomu [4, 81]: najwolniej naprawiana jest chromatyna transkrypcyjnie nieczynna, np. chromosomu X, naprawa genów aktywnych jest szybsza, zaś naprawa transkrybowanych nici genów aktywnych przyspieszona. W hierarchii tej nie mieszczą się geny rRNA, co wykryli *Vosi* i *Wauthier* [82]; geny te naprawiane są z mniejszą wydajnością niż średnio biorąc cały genom. *Vos* w swoim błyskotliwym przeglądzie [83] nazwał je "repair cold spots" i próbował tłumaczyć ich istnienie swoistymi właściwościami polimerazy I RNA lub rodzajem tworzonego przez nią kompleksu transkrypcyjnego. W odróżnieniu od innych genów, których transkrypcję prowadzi polimeraza II, geny rRNA są bowiem transkrybowane przez polimerazę I RNA.

Płodną badawczo wydaje się zaproponowana przez *Mullenders* i w s p. [8] hipoteza związku przyczynowego między upośledzoną naprawą genów utrzymujących komórkę przy życiu (*house keeping genes*) i powstawaniem anomalii neurologicznych. Jest ona oparta na analizie naprawy w genach HPRT i ADA w grupach komplementacyjnych XP i CS. Ważnym biologicznie skutkiem heterogenności naprawy jest nierównomierny rozkład mutacji w różnych obszarach genomu, oraz zmniejszenie częstości w niciach transkrybowanych [18, 84, 85]. Wolniejsza i nie-

kompletna naprawa genów nieczynnych, w szczególności niektórych protoonkogenów, może prowadzić do mutacji i transformacji nowotworowej. W ten sposób tłumaczy się występowanie nowotworzenia w XP-C, grupie komplementacyjnej, w której naprawa w genach czynnych jest normalna, zaś upośledzenie dotyczy naprawy całego DNA komórkowego [81].

Komórki wrażliwe na UV czy to ludzkie, czy gryzoni wykazują upośledzenie naprawy nici transkrybowanej i — jak wynika z badań prowadzonych na genie HPRT — w tej właśnie nici, w przeciwieństwie do komórek normalnych, zlokalizowana jest większość mutacji [84-86]. Wynik ten próbuje się tłumaczyć różnicą częstości błędów w syntezie DNA na uszkodzonych niciach, transkrybowanej i nietranskrybowanej [18, 81]. Vos [83] sugeruje, że częstość mutacji w obu niciach może zależeć od względnej orientacji replikacji i transkrypcji w danym genie. Hipotezę tę można sprawdzić przy użyciu uszkodzonych promieniowaniem UV wektorów wahadłowych (*shuttle vectors*) zawierających odpowiednie geny reporterowe. Wektory te, po wprowadzeniu do komórek zwierzęcych, są w nich naprawiane, replikowane i transkrybowane [87, 88], zaś skuteczność naprawy można ocenić na podstawie ekspresji w komórkach bakterii.

Osobiście sądzę, że w mutantach wrażliwych zwiększona częstość mutacji w nici transkrybowanej wiąże się raczej z defektem któregoś z czynników TRCF, których komórka zwierzęca musi zawierać kilka. Defekt taki prowadziłby bowiem do upośledzenia naprawy uszkodzeń w nici transkrybowanej, a tym samym do zwiększonej częstości mutacji. Zauważmy, że bakteryjny czynnik TRCF jest kodowany przez gen *mdf+*, tj. gen odpowiedzialny za spadek mutacji.

V. Genetyczna kontrola naprawy

Listę sklonowanych genów mających udział w naprawie różnego rodzaju uszkodzeń znajdzie czytelnik

w pracy [3]. W sumie sklonowano ich ponad 20. Tabela 1 przedstawia najlepiej poznaną grupę genów związanych z naprawą przez wycięcie nukleotydu. Do ich sklonowania użyto, z wyjątkiem genu XPAC i XPGC, otrzymane w laboratorium mutanty komórek chomika chińskiego, wrażliwe na UV [89]. Mutanty te, upośledzone w etapie rozpoznania i nacinania, zostały zaklasyfikowane do 10 grup komplementacyjnych oznaczonych numerami od 1 do 10. Okazały się one dobrymi odbiorcami ludzkiego DNA. Z transfektantów, które odzyskały normalną wrażliwość na promieniowanie UV, izolowano ludzki DNA odpowiedzialny za skorygowanie defektu. Tak otrzymane geny korygowały wrażliwość na promieniowanie UV występującą w naturalnych mutacjach ludzkich: XP, CS i TTD.

ERCC1 jest jedynym ludzkim genem etapu nacięcia którego koniec C wykazuje słabą homologię do bakteryjnego genu UVrA i UVrC [90]. Fakt, że inne geny nie wykazują homologii do genów bakteryjnych, natomiast sekwencja ich u *Eukaryota* jest w niewielkim stopniu zmienna, tłumaczy się tym [6, 7], że w organizmach eukaryotycznych odmienny jest substrat enzymów naprawczych, tj. DNA upakowany w skomplikowany sposób w chromatynie.

Gen ERCC2 koryguje defekt w XP-D i TTD [91] i ma swoje homologie w genach RAD3 *S. cerevisiae* [92] i rad15 *S. pombe* [93]. Oba geny są niezbędne (*essential*) dla istnienia komórki; RAD3 koduje aktywność helikazową, która prawdopodobnie nie jest istotna dla jego podstawowej funkcji [94], zaś pełni rolę w naprawie DNA. Aktywność ta jest hamowana przez wiele uszkodzeń DNA, co sugeruje, że spełnia ona funkcje tropiciela i znacznika ich lokalizacji. Możemy przypuszczać, że białko ERCC2 pełni podstawową rolę w komórkach ludzkich.

Gen ERCC3, który koryguje fenotyp XP-B i CS-C i koduje aktywność helikazową [95] ma swoje odpowiedniki w genach RAD25 (SSL2) w *S. cerevisiae* [12, 96], ERCC2^{SP} w *S. pombe* [97] i haywire w *D.*

Tabela 1.

Ludzkie geny naprawy przez wycinanie nukleotydu zaangażowane w etapie nacięcia^a

Gen ^b	Ludzka mutacja	Lokalizacja chromosom.	Cechy białka	Homologia ^c			
				<i>E. coli</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. pombe</i>	<i>D. melanogaster</i>
ERCC1	XP-D, TTD XP-B, CS-C	19q13.2	helikaza helikaza	d	RAD10	swi10 ^e	haywire
ERCC2		19q13.2		—	RAD3	rad15	
ERCC3		2q21		—	RAD25 (SSL2)	ERCC3 ^{SP}	
ERCC5	XP-G CS-B	10q11	helikaza	—	RAD2	rad13 ^e	brahma lodestar
ERCC6				—	RAD54, RAD16 SNF2, STH1 MOT1, FUN30		
				—	RAD5		
XPAC				XP-A	9q34	—	

^a Szczegółową charakterystykę genów znajdzie czytelnik w przeglądach [2, 5-8, 13]

^b Geny ERCC4, ERCC7 — 10 komplementujące mutanty należące do grup komplementacyjnych 4,7-10 czekają na sklonowanie [89]

^c — oznacza brak homologii, miejsce puste oznacza, że mutant jest nieznan lub gen nie sklonowany

^d Koniec C genu wykazuje słabą homologię do fragmentu genu UVrA i UVrC [90]

^e Niepublikowane dane Lehmana i wsp. wg [8]

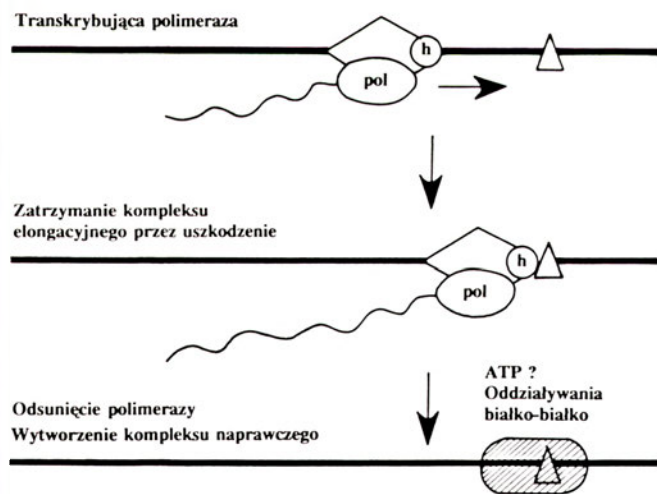
melanogaster [94]. Geny RAD25 i haywire są komórce niezbędne. Gulyas i Donahue [12] przypisują genowi SSL2 rolę pośrednią w naprawie DNA. Według tej hipotezy domniemana helikaza SSL2 jest istotna w inicjacji transkrypcji jednego lub większej liczby genów kodujących polipeptydy bezpośrednio biorące udział w procesach naprawy.

Ostatnie rewelacyjne doniesienie [9] potwierdza przypuszczenie, że również gen ERCC3 pełni rolę pośrednią w naprawie DNA. Kodowane przez ERCC3 białko odpowiada jednej z podjednostek niezbędnego komórce czynnika transkrypcyjnego BTF2 (TFIIH). Jednostka ta o masie 89 kDa posiada aktywność helikazy zależną od ATP oraz aktywność kinazową w obszarze końca C. Ta sama helikaza może więc dokonywać rozdzielania nici DNA zarówno w transkrypcji, jak i naprawie, zaś sprzężenie obu procesów zachodzi w sposób przedstawiony na rycinie 2.

Na koniec warto zauważyć, że nieprawidłowa kontrola transkrypcji przeprowadzona przez gen ERCC3 zmutowany u pacjentów XP-B i CS-C może stanowić molekularną podstawę różnicowania fenotypów tych pacjentów.

Niedawno opublikowano doniesienia, iż gen ERCC5 jest tożsamy z XPGC i homologiczny do genu *zabiego* oraz do genu RAD2 *S. cerevisiae* [99, 100].

Hipoteza roli pośredniej dotyczy, jak sądzę, także genu ERCC6 sklonowanego przez Troelstra i w s p. [101]. Ten duży gen (kodujący białka złożone z 1460 aminokwasów) koryguje upośledzenie komórek



Ryc. 2. Sprzężenie naprawy i transkrypcji. Modyfikacja propozycji Buratowskiego [11]. Polimeraza RNA (pol) syntetyzuje RNA na transkrybowanej nici DNA (—). Synteza jest poprzedzona rozdzielaniem obu nici przez helikazę (h), z wytworzeniem oczka transkrypcyjnego (◇). Napotykać uszkodzenie DNA (△) helikaza (w przypadku komórek zwierzęcych będzie to kodowane przez gen ERCC3 [9] białko TFIIH i/lub być może inne białka, np. kodowane przez ERCC6 [10], zaś w przypadku *E. coli* białko TRCF [75]) może odsunąć zatrzymaną polimerazę, umożliwiając enzymom naprawczym dostęp do uszkodzenia. Wytworzenie kompleksu naprawczego polega, przynajmniej w przypadku TRCF (*E. coli*), na aktywnym dookooperowaniu białek naprawczych poprzez oddziaływania białko-białko.

CS-B w przeprowadzeniu naprawy preferencyjnej [10]. Koduje on 7 białek z silną homologią do podrodziny helikaz DNA i RNA biorących udział w replikacji, rekombinacji, naprawie i ekspresji DNA [102]. Identyfikacja mutacji w obu alelach komórek pacjentów CS-B wskazuje, że zmutowane grupy kodują skrócone (*truncated*) polipeptydy. Jak możemy domniemywać na podstawie dużej liczby genów homologicznych [10, 103], potencjalne funkcje ERCC6 są wielorakie. RAD54 jest wymagany do rekombinacyjnej naprawy pęknięć podwójnoniciowych DNA [92]. RAD16 jest potrzebny do przeprowadzenia naprawy przez wycięcie w nieczynnym genie HML α [104] i prawdopodobnie w innych nieczynnych obszarach genomu *S. cerevisiae*. RAD5, znany również jako REV2, jest wymagany dla mutagenyzy indukowanej przez promieniowanie UV i dla bezbłędnej (*error free*) naprawy zależnej od genu RAD18 [103]. Inne geny homologiczne do genu ERCC6 nie mają zidentyfikowanej roli w naprawie DNA, natomiast uważa się, że biorą udział w regulacji transkrypcji: SNF2 [105, 106], MOT1 [107], FUN30 [105], brahma (brm), [108] i gen zahamowania niestabilności chromosomów: lodestar [109]. Istnieją zatem podstawy aby na zespół CS spojrzeć jako na „zespół zaburzonej transkrypcji”. Troelstra i w s p. [9] sądzą, że aktywność helikazy białka ERCC6 służy odszczepieniu kompleksu polimerazy RNA od DNA lub, że białko to zmusza polimerazę do przejścia przez uszkodzenie albo do cofnięcia się (por. Ryc. 2.). Oba mechanizmy zapewniałyby możliwość przyłączenia się białek naprawczych do uszkodzenia. Dalej Troelstra i w s p. przypuszczają również, iż ważną funkcją helikaz kodowanych przez ERCC6 może być uwolnienie określonych obszarów DNA z białek, czy to w celu przeprowadzenia naprawy, czy też transkrypcji i składania RNA — por. [110].

Warto zauważyć, że na sześć ze sklonowanych genów etapu rozpoznania i nacięcia aż trzy kodują aktywność helikazową. Nie sądzę, żeby była to ostateczna liczba helikaz czynnych we wczesnym etapie naprawy przez wycinanie w komórkach zwierzęcych. W organizmie tak prostym jak *E. coli* w naprawie przez wycinanie biorą udział helikazy UVrA i UVrD, zaś ogólna znana liczba helikaz występujących w tej komórce wynosi 10 [111]. Obecnie znamy 30 helikaz, w tym 7 wirusowych i 6 ludzkich [112].

Na koniec pragnę zauważyć, iż omawiana hipoteza roli „genów naprawy DNA” nie tylko tłumaczy różnorodność fenotypową XP, CS i TTD w obrębie cech takich jak nowotworzenie, anomalie rozwojowe i neurologiczne; ma ona też istotne znaczenie dla naszego myślenia o genetycznej kontroli naprawy DNA. Podstawowym założeniem w klonowaniu genów naprawy DNA jest, iż zmutowany gen naprawy powoduje wrażliwość na dany czynnik genotoksyczny. Każdy mutant wrażliwy uważany jest zatem za organizm ze zmienionym genem naprawy DNA. Rozumowanie

takie, wygodne ze względów praktycznych, powoduje, iż zapominamy czasem, że genetyczna kontrola naprawy może mieć charakter zarówno bezpośredni jak i pośredni. Badania ostatnich dwóch lat dowodzą, iż naprawa zależy bezpośrednio od genów kodujących białka biorące w niej udział, pośrednio zaś od genów kontrolujących transkrypcję, redagowanie RNA i syntezę białek naprawczych.

Artykuł otrzymano 12 czerwca 1993 r.
Zaakceptowano do druku 4 marca 1994 r.

Piśmiennictwo

- Shivji MKK, Kenny MK, Wood RD (1993) *Cell* **69**: 367-374
- Huang J-C, Svoboda DL, Reardon JT, Sancar A (1992) *Proc Natl Acad Sci* **89**: 3664-3668
- Lehmann AR, Hoeijmakers JHJ, van Zeeland AA, Backendorf C MP, Bridges BA, Collins A, Fuchs RPD, Margison GP, Montesano R, Moustacchi E, Natarajan AT, Radman M, Sarasin A, Seedberg E, Smith CA, Stefanini M, Thompson LH, van der Schans GP, Weber CA, Zdzienicka MZ (1992) *Mutation Res* **273**: 1-28
- Bohr V (1991) *Carcinogenesis* **12**: 1983-1992
- Hoeijmakers JHJ, Bootsma D (1990) *Cancer Cells* **2**: 311-320
- Weeda G, Hoeijmakers JHJ, Bootsma D (1993) *BioEssays* **15**: 249-258
- Hoeijmakers JHJ (1991) *J Cell Sci* **100**: 687-691
- Friedberg EC (1992) *Cell* **71**: 887-889
- Schaeffer L, Roy R, Humbert S, Moncolin V, Vermeulen W, Hoeijmakers JHJ, Chambon P, Egly J-M (1993) *Science* **260**: 58-63
- Troelstra C, van Gool A, de Wit J, Vermeulen W, Bootsma D, Hoeijmakers JHJ (1992) *Cell* **71**: 939-953
- Buratowski S (1993) *Science* **260**: 37-38
- Gulyas K D, Donahue TF (1992) *Cell* **69**: 1031-1042
- Bootsma D, Hoeijmakers JHJ (1993) *Nature* (Lond) **363**: 114-115
- Pietrzykowska I (1987) W: Lasota Z (red) *Biologia Molekularna*. Państwowe Wydawnictwo Naukowe, Warszawa, str 488-515
- Bohr VA, Phillips DH, Hanawalt PC (1987) *Cancer Res* **47**: 6426-6436
- Brash DE, Haseltine WA (1982) *Nature* (Lond) **298**: 189-192
- Gordon LK, Haseltine WA (1982) *Radiat Res* **89**: 99-103
- Vrieling H, Zhang L-H, van Zeeland AA, Zdzienicka MZ (1992) *Mutation Res* **274**: 147-155
- Briscoe WT, Cotter L-E (1984) *Chem-Biol Interact* **52**: 102-110
- Briscoe WT, Cotter L-E (1985) *Chem-Biol Interact* **56**: 321-331
- Koostra A, Slaga TJ, Olins DE (1979) *Chem-Biol Interact* **28**: 225-236
- Jack PL, Brokes P (1981) *Nucl Acids Res* **9**: 5533-5552
- Sudhakar E, Tew KD, Schein PS, Wooley PV, Smulson ME (1979) *Cancer Res* **39**: 1411-1413
- Berkowitz EML, Silk H (1981) *Cancer Lett* **12**: 311-321
- Sogo JM, Ness PJ, Widmer RM, Parish RW, Koller T (1984) *J Mol Biol* **178**: 887-928
- Kaneko M, Cerutti P (1980) *Cancer Res* **40**: 4313-4319
- Gross DS, Garrad WT (1987) *Trends Biochem Sci* **12**: 293-297
- Metzger G, Wilhem FX, Wilhem ML (1977) *Biophys Res Commun* **75**: 703-706
- Chekulaev VA, Lobanienkov VV, Karamysheva AF, Shelepov VP, Mironov NM, Shapot VS (1984) *Biochimya* **49**: 1515-1522
- Oleinik NL, Chiu SM, Friedman LR (1984) *Radiat Res* **98**: 629-641
- Williams J, Friedberg EC (1979) *Biochemistry* **18**: 3965-3972
- Friedberg EC (1985) *DNA Repair* Freeman WH and Co New York
- Kaufmann WK (1989) *Carcinogenesis* **10**: 1-11
- Sutherland BK M (1981) *J Invest Dermatol* **77**: 91-95
- Lindahl T, Sedgwick B, Sekiguchi M, Nakabeppu I (1988) *Annu Rev Biochem* **57**: 133-157
- Sakumi K, Sekiguchi M (1990) *Mutation Res* **236**: 161-172
- Lasko DD, Tomkinson AE, Lindahl T (1990) *Mutation Res* **236**: 277-287
- Janion C (1992) *Post Biochem* **38**: 55-58
- Van Houten B, Snowden A (1993) *BioEssays* **15**: 51-59
- Wood RD, Robins P, Lindahl T (1988) *Cell* **53**: 97-106
- Barnes DE, Tomkinson AE, Lehmann AR, Webster DB, Lindahl T (1992) *Cell* **69**: 495-503
- Cleaver JE (1968) *Nature* (Lond) **218**: 652-656
- Walicka M (1975) *Post Hig Med Dosw* **29**: 595-618
- Lehmann AR, Karran P (1981) *Int Rev Cytol* **72**: 101-146
- Lehmann AR, Dean SW (1989) W: Cooper CS, Grover PL (red) *Handbook of Experimental Pharmacology* t 94/II, Springer Berlin, str 71-101
- Cleaver JE, Kraemer KH (1989) W: Seriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (red) *The Metabolic Bases of Inherited Disease*, t II Mc Graw-Hill Inc, New York, str 2949-2971
- Warters R, Jones CJ, Martin EA, Yang A-L, Jones NJ (1992) *Mutation Res* **273**: 145-156
- De Weerd Kastelein EA, Keijzer W, Bootsma D (1972) *Nature New Biol* **238**: 80-83
- Bootsma D, Keijzer W, Jung EG, Bohnert E (1989) *Mutation Res* **218**: 149-151
- Vermeulen W, Stefanini M, Giliani S, Hoeijmakers JHJ, Bootsma D (1991) *Mutation Res* **255**: 201-203
- De Jonge AJR, Vermeulen W, Keijzer W, Hoeijmakers JHJ, Bootsma D (1985) *Mutation Res* **150**: 99-105
- Lehmann AR, Kirk-Bell S, Arlett C, Paterson MC, Lohman PHM, de Weerd-Kastelein EA, Bootsma D (1975) *Proc Natl Acad Sci* **72**: 219-223
- Boyer JC, Kaufmann WK, Brylawski BP, Coedero-Stone (1990) *Cancer Res* **50**: 2593-2598
- Misra RR, Vos J-MH (1993) *Mol Cell Biol* **13**: 1002-1012
- Nance MA, Berry SA (1992) *Am J Med Genet* **42**: 68-84
- Lehmann AR (1982) *Mutation Res* **106**: 347-356
- Venema J, Mullenders LHF, Natarajan AT, van Zeeland AA, Mayne LV (1990) *Proc Natl Acad Sci* **87**: 4707-4711
- Brouhgtton BC, Lehmann AR, Harcourt SA, Arlett CE, Sarasin A, Kleijer WJ, Beemer FA, Nairn R, Mitchel DL (1990) *Mutation Res* **235**: 33-40
- Stefanini M, Lagomarsini P, Arlett CF, Marioni S, Borrone C, Crovato F, Trevisan G, Gordone G, Nuzzo F (1986) *Human Genet* **74**: 107-112
- Lehmann AR, Norris PG (1989) *Carcinogenesis* **10**: 1353-1356
- Vuillaume M, Daya-Grosjean L, Vincens P, Pennetier JL, Tarroux Ph, Baret A, Calvayrac R, Taieb A, Sarasin A (1992) *Carcinogenesis* **13**: 321-328
- Nocentini S (1992) *Mutation Res* **284**: 275-287
- Mayne LV, Lehmann AR (1982) *Cancer Res* **42**: 1473-1478
- Mullenders LHF, van Kesteren AC, Bussman CJM, van Zeeland AA, Natarajan AT (1986) *Carcinogenesis* **7**: 995-1002
- Mullenders LHF, van Kesteren-van Leeuwen AC, van Zeeland AA, Natarajan AT (1988) *Nucleic Acids Res* **16**: 10607-10622

66. Bohr VA, Okumoto DS (1988) W: Friedberg EC, Hanawalt PC (red) DNA Repair: A Laboratory Manual III. Marcel Dekker, New York, str 347-366
67. Mellon J, Spivak G, Hanawalt PC (1987) *Cell* **51**: 241-249
68. Bohr VA, Smith CA, Okumoto DS, Hanawalt PC (1985) *Cell* **40**: 359-369
69. Mellon I, Hanawalt PC (1989) *Nature (Lond)* **342**: 95-98
70. Terleth C, van Sluis CA, van de Putte P (1989) *Nucleic Acids Res* **17**: 4433-4439
71. Bohr VA, Evans MK, Fornace AJ (1989) *Lab Invest* **61**: 143-161
72. Goldman MA (1988) *BioEssays* **9**: 50-55
73. Bohr VA, Okumoto DS, Ho L, Hanawalt PC (1986) *J Biol Chem* **261**: 16666-16672
74. De Cock JGR, Klink ED, Ferro W, Lohman PHM, Eeken JCJ (1991) *Nucleic Acids Res* **19**: 3289-32
75. Hanawalt PC (1989) *Genome* **31**: 605-611
76. Selby CP, Sancar A (1991) *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 8232-8236
77. Selby CP, Witkin EV, Sancar A (1991) *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 11574-11578
78. Selby CP, Sancar A (1993) *Science* **260**: 53-58
79. Zelle B, Reynolds RJ, Kottenhagen HJ, Schutte A, Lohman PHM (1980) *Mutation Res* **72**: 491-509
80. van Zeeland AA, Smith CA, Hanawalt PC (1981) *Mutation Res* **82**: 173-189
81. Mullenders LHF, Vrieling H, Venema J, van Zeeland AA (1991) *Mutation Res* **250**: 223-228
82. Vos J-MH, Wauthier EL (1991) *Mol Cell Biol* **11**: 2245-2252
83. Vos J-MH (1992) *Curr Opinion in Cell Biol* **4**: 385-395
84. McGregor WG, Chen R-H, Lukash L, Maher VM, McCormick JJ (1991) *Mol Cell Biol* **11**: 1927-1934
85. Menichini P, Vrieling H, van Zeeland AA (1991) *Mutation Res* **251**: 143-155
86. Dorado GH, Steingrimsdottir, Arlett CF, Lehmann AR (1991) *J Mol Biol* **217**: 217-222
87. Ganesan AK, Spivak G (1988) W: Friedberg EC, Hanawalt PC (red) DNA Repair: A Laboratory Manual t III. Marcel Dekker, New York, str 295-308
88. Sarasin A (1989) *J Phot Photobiol* **3**: 143-155
89. Collins AR (1993) *Mutation Res* **293**: 99-118
90. van Duin M, van den Tel J, Warmerdam P, Odijk H, Meijer D, Westerveld A, Bootsma D, Hoeijmakers JHJ (1988) *Nucleic Acids Res* **16**: 5305-5322
91. Fletjer WL, McDaniel LD, Jolms D, Friedberg EC, Schultz RA (1992) *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 261-265
92. Friedberg EC, Siede W, Cooper AJ (1991) W: Broach J, Jones E, Pringle J (red) The Molecular and Cellular Biology of the Yeast *Saccharomyces*, t I. Cold Spring Harbor Laboratory Press New York str 147-192
93. Murray JM, Doe CL, Schenk P, Carr AH, Lehmann AR, Watts FZ (1992) *Nucl Acids Res* **20**: 2673-2678
94. Sung L, Higgins D, Prakash L, Prakash S (1988) *EMBO J* **7**: 3263-3269
95. Weeda G, van Ham RCA, Vermeulen W, Bootsma D, van der Eb AJ, Hoeijmakers JHJ (1990) *Cell* **62**: 777-791
96. Park E, Guzder SN, Koken MHM, Jaspers-Dekker J, Weeda G, Hoeijmakers JHJ, Prakash S, Prakash L (1992) *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 11416-11420
97. Lehmann AR, Carr AM, Waats FZ, Murray JM (1991) *Mutation Res* **250**: 205-210
98. Monnkes LC, Jones RS, Liang BC, Gelbert W, Fuller MT (1992) *Cell* **71**: 925-938
99. Scherly D, Nouspikel T, Corlet J, Ucla C, Bairoch A, Clarkson SG (1993) *Nature (Lond)* **363**: 182-185
100. O'Donovan A, Wood R (1993) *Nature (Lond)* **363**: 185-188
101. Troelstra C, Odijk H, de Wit J, Westerveld A, Thompson LH, Bootsma D, Hoeijmakers JHJ (1990) *Mol Cell Biol* **10**: 5806-5813
102. Gorbalenya AE, Koonin EV, Dobchenko AP, Blinov VM (1989) *Nucleic Acids Res* **17**: 4713-4730
103. Johnson RE, Henderson ST, Petes TD, Prakash, Bankmann M, Pralcosh L (1992) *Mol Cell Biol* **12**: 3807-3818
104. de Bang D, Verhage R, Goosen N, Brouwer J, van de Putte P (1992) *Nucl Acids Res* **20**: 3925-3931
105. Clark MW, Zhong WW, Keng T, Storms RK, Barton A, Kaback DB, Bussey H (1992) *Yeast* **8**: 133-145
106. Laurent BC, Yang X, Carlson M (1992) *Mol Cell Biol* **12**: 1893-1902
107. Davis JL, Kunisawa R, Thorner J (1992) *Mol Cell Biol* **12**: 1879-1892
108. Tamkun JW, Deurin R, Scott MP, Kissinger M, Paltatucci AM, Kaufman TC, Kennison JA (1992) *Cell* **68**: 561-572
109. Girdham CH, Glover DM (1991) *Genes Dev* **5**: 1786-1799
110. Ruby SW, Abelson J (1991) *Trends Genet* **7**: 79-85
111. Matson SW (1991) *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **40**: 282-326
112. Thömmes P, Hübsher U (1992) *Chromosoma* **101**: 467-473

**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**

Mukowiscydoza — podstawy wprowadzenia somatycznej terapii genowej

Cystic fibrosis — the principle of somatic gene therapy

JERZY BAL*

Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Podłoże molekularne mukowiscydozy — osiągnięcia ostatnich lat
- III. Somatyczna terapia genowa mukowiscydozy
 - III-1. Model zwierzęcy terapii genowej
 - III-1-1. Konstrukcja modelu zwierzęcego CF
 - III-1-2. Somatyczna terapia genowa u zwierząt
 - III-2. Somatyczna terapia genowa u człowieka.
- IV. Nowe koncepcje terapeutyczne
- V. Zakończenie

Contents:

- I. Introduction
- II. Molecular basis of cystic fibrosis — recent study results
- III. Somatic gene therapy
 - III-1. Animal model of gene therapy
 - III-1-1. Creation of CF animal model
 - III-1-2. Animal somatic gene therapy
 - III-2. Human somatic gene therapy
- IV. New therapeutic methods
- V. Concluding remarks

Wykaz stosowanych skrótów: CF — mukowiscydoza (*cystic fibrosis*); CFTR — nazwa genu i kodowanego w nim białka (*cystic fibrosis transmembrane regulator*); HPRT — gen kodujący fosforybozylotransferazę hypoksantynową, kb — tysiąc par zasad.

I. Wstęp

Mukowiscydoza jest chorobą genetycznie uwarunkowaną, dziedziczącą się jako cecha autosomalna recesywna. Niewydolność funkcjonowania gruczołów wydzielania zewnętrznego i nawracające infekcje dróg oddechowych są bezpośrednią przyczyną zgonu chorych na mukowiscydozę. W populacji europejskiej choroba występuje z częstością 1 na 2500 noworodków. Jest ona wynikiem mutacji położonego w chromosomie 7 genu CFTR. Gen ten o wielkości około 250 kb zbudowany jest z 27 eksonów i koduje białko złożone z 1480 aminokwasów. Pięć procent populacji jest nosicielami zmutowanego genu CFTR.

Mukowiscydoza jest chorobą nieuleczalną. Dzięki nowym środkom farmakologicznym i nowym metodom terapeutycznym średnia długość życia chorych na mukowiscydozę wydłużyła się i przekracza obecnie 30 lat. *Postępy Biochemii* zamieściły artykuły zarówno o podłożu molekularnym mukowiscydozy jak i funkcji białka kodowanego w genie CFTR [1, 2].

Pierwsza eksperymentalna terapia genowa mukowiscydozy u człowieka, została przeprowadzona w kwietniu 1993 r. w zespole R. Crystala (Bethesda, USA). Zdolny do pełnej ekspresji cDNA genu CFTR, sklonowany w adenowirusie wprowadzono do komórek nabłonkowych dróg oddechowych chorego na mukowiscydozę. Podjęta w sierpniu 1993 r., przez zespół brytyjski, terapia genowa mukowiscydozy różni się od amerykańskiej sposobem przenoszenia genu CFTR. W projekcie brytyjskim sklonowany w plazmidzie cDNA genu wprowadzany jest do komórek nabłonkowych w liposomach.

Terapia genowa mukowiscydozy jest jedyną z pierwszych tego typu prób leczenia jakie podjęto w chorobach genetycznie uwarunkowanych. W 1990 r. terapię genową zastosowano w leczeniu zespołu złożonego braku oporności, a niedawno w rodzinnej hypercholesterolemii. Planowane jest również rozpoczęcie badań klinicznych w terapii jednej z form hemofilii [3].

II. Podłoże molekularne mukowiscydozy — osiągnięcia ostatnich lat

Do końca 1993 r. opisano ponad 450 różnych zmian w genie CFTR z czego 380 stanowiły mutacje (CF *Genetic Analysis Consortium*). Większość z nich to mutacje punktowe. Dopiero ostatnio opisano dużą 40 kb delecję obejmującą eksony od 11 do 18 [4]. Najczęściej występującą mutacją w genie CFTR jest — trójnukleotydowa delecja w eksonie 10 — $\Delta F508$. W populacji kaukaskiej (białej) występuje ona z częstością około 70% [5]. Na podstawie badania między innymi sprzężeniu z wysoce informacyjnymi (zmiennymi) wewnątrzgenowymi markerami polimorficznymi

* Dr, Zakład Genetyki Instytut Matki i Dziecka 01-211 Warszawa, ul. Kasprzaka 17a

wyliczono, że mutacja ta powstała co najmniej 53 tysiące lat temu [6].

Większość z poznanych do tej pory zmian w genie CFTR to mutacje rzadkie, charakterystyczne dla grupy etnicznej lub określonej rodziny. Poza wspomnianą mutacją $\Delta F508$, częstość występowania kilkunastu innych mutacji, zlokalizowanych głównie w eksonach kodujących białkowe domeny wiążące nukleotydy, mieści się w granicach 1-3% [5]. Tylko w populacji Żydów askenazyjskich [7], populacjach celtyckich [8] i u Francuzów z Quebecu [9] wykrywalność mutacji w genie CFTR przekracza 93%.

W diagnostyce mukowiscydozy wykorzystanie identyfikacji mutacji jako jedyne badania diagnostycznego jest więc ograniczone do kilku populacji. Warto jednak przypomnieć, że — w rodzinach gdzie nie zidentyfikowano żadnej lub też zidentyfikowano jedną mutację — analiza dziedziczenia się wewnątrzgenowych lub sprzężonych z genem markerów polimorficznych umożliwia uzyskanie wyniku diagnostycznie informacyjnego. Nawet więc w populacjach o niskiej częstości wykrywania mutacji, diagnostycznie pożądany wynik (identyfikacja mutacji i/lub określenie sposobu dziedziczenia się zmutowanego genu w rodzinie ryzyka) bywa bliski 100%.

Badania korelacji genotyp/fenotyp umożliwiły wyodrębnienie mutacji tzw. „silnych”, którym towarzyszy niewydolność enzymatyczna trzustki i zmienne objawy płucne oraz mutacje „słabe” z granicznymi wartościami chlorków w pocie, charakteryzujące się łagodnymi zmianami płucnymi. Pewnym paradoksem wydaje się być fakt, że o ile 95% chorych na mukowiscydozę umiera w wyniku powikłań płucnych to korelacja genotyp/fenotyp w większym stopniu dotyczy zmian trzustkowych [5, 10, 11]. Ważną obserwacją jest wykazanie występowania mutacji w genie CFTR w chorobach klasyfikowanych do niedawna jako oddzielne zespoły kliniczne [12, 13].

Białko kodowane przez gen CFTR pełni rolę wielojonowego kanału chlorkowego w komórkach nabłonkowych płuc i gruczołów wydzielania zewnętrznego [14]. Przypisuje mu się również udział w transporcie jonów sodowych [15].

Ekspresję białka CFTR wykazano w wielu tkankach organizmu człowieka. Największą koncentrację stwierdzono w tkankach nabłonkowych trzustki, jelita, gruczołów potowych i przewodów rozrodczych [16]. Badania immunochemiczne wykazały, że w podśluzówkowych gruczołach komórek nabłonkowych dróg oddechowych białko CFTR występuje w stosunkowo małym stężeniu [17].

Białku CFTR przypisuje się ważną rolę w rozwoju płodowym. Obecność mRNA CFTR wykazano w komórkach nabłonkowych wielu narządów, a poziom ekspresji w komórkach nabłonkowych płuc u płodu jest wyższy niż u osób dorosłych [18].

Z punktu widzenia terapii genowej istotną okazała się informacja, że do prawidłowego fenotypu wystar-

czają 1-2 kopie mRNA CFTR na komórkę [19] i że 6-8% transkryptu CFTR wystarcza do supresji fenotypu CF [20]. Wykazano ponad to, że nadmiar produkcji białka CFTR nie wpływa szkodliwie na funkcjonowanie komórek [21].

Nie udało się określić zasad regulacji genu CFTR. Nie są też znane żadne mutacje promotorowe tego genu. W dalszym ciągu nie wyjaśniona jest również rola produktów alternatywnej obróbki transkryptów stwierdzanych w wielu tkankach. Wydaje się, że ich obecność może, poza jądrami [22], mieć niewielkie znaczenie fizjologiczne, występują bowiem zarówno w tkankach ludzi zdrowych, jak i chorych na mukowiscydozę [23].

III. Somatyczna terapia genowa mukowiscydozy

Sklonowanie genu CFTR zapoczątkowało serię eksperymentów, które doprowadziły w efekcie do podjęcia somatycznej terapii genowej u człowieka. W pierwszych doświadczeniach wykazano, że sklonowany w retrowirusie cDNA genu CFTR jest zdolny do korekcji fenotypu CF w hodowlach tkankowych [24, 25]. Od tego momentu ukształtowały się wirusowa i nie wirusowa strategia wprowadzania genu CFTR do komórek nabłonkowych.

Wybór adenowirusa, który zastąpił wektor retrowirusowy, był nieprzypadkowy. Infekuje on naturalnie nabłonki dróg oddechowych, do infekcji nie wymaga podziału komórek, nie powoduje zmian nowotworowych, oraz łatwo jest uzyskać jego wysokie miano. Jako wektor pozbawiony jest genów niezbędnych do samoreplikacji i infekcji. Może przenosić fragmenty DNA do 10 kb [26].

W terapii mukowiscydozy rozważane jest także użycie jako wektora wirusa adenosatelitarnego (AAV). Główną zaletą tego systemu jest preferencyjna integracja z genomem gospodarza w określonym miejscu chromosomu 19. Podstawową natomiast wadą jest ograniczona wielkość przenoszonych fragmentów DNA, która nie może przekraczać 4 kb [27].

Kationowe liposomy mogą wprowadzać z kolei do komórek fragmenty DNA o wielkości do 150 kb. Charakteryzują się ponad to niską immunogennością i są handlowo łatwo dostępne [28].

Równie wielkie cząsteczki kwasów nukleinowych mogą być wprowadzane do komórek na drodze endocytozy poprzez odpowiednie receptory komórkowe [29]. W niedługim czasie należy oczekiwać zastosowania tej metody w terapii mukowiscydozy.

III-1. Model zwierzęcy terapii genowej

Potrzeba lepszego zrozumienia patogenezy i patofizjologii chorób, testowanie nowych środków farmaceutycznych oraz możliwość dokonywania manipulacji genetycznych stały się głównymi przesłankami do

badan, których celem było stworzenie zwierzęcych modeli chorób genetycznie uwarunkowanych [30]. Szereg chorób dziedzicznych występujących u człowieka ma swoje naturalne modele zwierzęce. Przykładem może być hemofilia u psa czy hypercholesterolemia u królika [31]. W przypadku mukowiscydozy stworzenie odpowiedniego modelu zwierzęcego wymagało przeprowadzenia szeregu eksperymentów genetycznych.

III-1.1. Konstrukcja modelu zwierzęcego CF

Myszy o genotypie cf/cf wyhodowano niezależnie w kilku ośrodkach badawczych. Chociaż zasada tworzenia takich myszy była identyczna [32], to w zależności od zastosowanej metody konstruowania defektu w genie CFTR otrzymano zwierzęta różniące się cechami fenotypowymi. W doświadczeniach wykonanych w Cambridge i na Uniwersytecie Północnej Karoliny strukturę genu CFTR rozbijano wstawiając w ekson 10 „obcy” fragment DNA. Wstawkami tymi były, odpowiednio, mini gen HPRT [33] i gen oporności na neomycynę [34]. W obu przypadkach stwierdzano brak białka CFTR. W przypadku myszy z Edynburga rozerwanie struktury genu polegało na częściowej duplikacji intronu 9 i eksonu 10. Jak się okazało nie eliminowało to całkowicie możliwości powstania prawidłowego transkryptu CFTR w wyniku alternatywnej obróbki. U myszy takich stwierdzano 0.4-3.2% normalnej aktywności białka CFTR [35].

Oprócz myszy z defektem genu CFTR, powstałym w wyniku „rozerwania” jego struktury, tworzone są modele, w których w strukturze genu występują określone (znane) mutacje, takie np. jak $\Delta F508$ [36]. W pierwszych doświadczeniach z terapią genową u zwierząt wykorzystano jednak myszy cf/cf z Północnej Karoliny i Edynburga.

Myszy z Północnej Karoliny podobnie jak myszy z Cambridge ginęły w ciągu 30 dni od urodzenia. Myszy z Edynburga w 90% osiągały dojrzałość a płodność samców była jedynie ograniczona (bezpłodność mężczyzn z CF jest jedną z podstawowych cech klinicznych mukowiscydozy). Charakterystyczne dla wszystkich myszy o genotypie cf/cf było wykazywanie zmian ze strony żołądka i jelita. Nie stwierdzono żadnych objawów trzustkowych. Łagodne objawy płucne wykazywano jedynie u dłużej żyjących myszy edynburskich.

Brak korelacji cech klinicznych choroby dziedzicznej człowieka z objawami występującymi w „modelach zwierzęcych” obserwowano kilkakrotnie. Myszy z defektem fosforybozylotransferazy hypoksantynowej ($hprt^-$) nie wykazują żadnych objawów fenotypowych charakterystycznych dla cech klinicznych chorego z zespołem Lesch-Nyhana. Mniej dramatycznie niż u ludzi przebiega rozwój myszy z mutacją w genie DMD (dystrofii mięśniowej typu Duchenna i Beckera), czy w genie kodującym białko p53 [32]. Mimo braku

pełnej korelacji cech klinicznych mukowiscydozy u człowieka z objawami fenotypowymi myszy o genotypie cf/cf, stworzenie takiego modelu umożliwiło wprowadzenie eksperymentalnej terapii genowej.

III-1.2. Somatyczna terapia genowa u zwierząt

W pierwszych doświadczeniach na zwierzętach wykazano przydatność adenowirusa jako wektora w ewentualnej terapii genowej. W doświadczeniach *in vivo* w komórkach nabłonkowych płuc małych myszy jak i w ludzkich komórkach nabłonkowych wszczepionych myszom wykazano ekspresję sklonowanego w adenowirusie genu lacZ i ludzkiego genu α_1 antytrypsyny [37-40]. Sklonowany w adenowirusie cDNA ludzkiego genu CFTR również ulegał ekspresji w komórkach nabłonkowych zwierząt. Nie obserwowano żadnych ubocznych skutków tej ekspresji. Nie stwierdzono również zmian histologicznych a zrekombinowane cząsteczki wirusa odnajdywano w zasadzie tylko w drogach oddechowych badanych zwierząt. Wykazano, że w komórkach nabłonkowych szczura białko CFTR jest obecne przynajmniej do 6 tygodni od infekcji. Po tym czasie niezbędna jest powtórna infekcja ponieważ adenowirus nie integrując się z genomem gospodarza jest naturalnie eliminowany wraz z ulegającą złuszczeniu warstwą komórek nabłonkowych.

Konieczność powtórnego wprowadzania do komórek nabłonkowych genu CFTR jest jedynym wspólnym elementem metody infekcji komórek zrekombinowanym adenowirusem i metody wprowadzania do komórek genu w liposomach. W pierwszych doświadczeniach na myszach, z zastosowaniem liposomów wprowadzono do komórek nabłonkowych dróg oddechowych geny β -galaktozydazy oraz acetylotransferazy chloramfenikolowej uzyskując pełną ekspresję obu tych genów [41]. Sklonowany w plazmidzie cDNA gen CFTR wprowadzony, w podobny sposób, do komórek nabłonkowych myszy o genotypie cf/cf znosi defekt genu CFTR zarówno w myszach z Edynburga [42] jak i Cambridge [28].

Znacznie mniej doświadczeń wykonano z wirusem AAV. Wykazano, że sklonowany w nim cDNA genu CFTR ulega ekspresji *in vivo* w komórkach nabłonkowych płuc królika, a obecność białka CFTR wykrywa się jeszcze w 6 miesięcy od wprowadzenia genu [43]. W czasie pisania tej pracy nie znane były doniesienia o zastosowaniu wektora AAV-CFTR w terapii genowej człowieka.

III-2. Somatyczna terapia genowa u człowieka

W grudniu 1992 r. Doradczy Komitet d/s Rekombinowanego DNA Amerykańskiego Instytutu Zdrowia (NIH) zatwierdził trzy projekty terapii genowej mukowiscydozy. Przewidywały one wprowadzenie sklonowanego w adenowirusie cDNA genu CFTR do komórek nabłonkowych oskrzeli lub nosa chorych na

mukowiscydozę. W projektach zaplanowano terapię kilkunastu osób dorosłych. W kwietniu 1993 r. jako pierwszy został poddany terapii 23-letni mężczyzna (z genotypem $\Delta F508/\Delta 508$) z zaawansowaną postacią mukowiscydozy. W kilka miesięcy później w zespole, kierowanym przez J. W e l s h a, poddano terapii trzy osoby: dwie kobiety: 21-letnią i 50-letnią, obie o genotypie $\Delta F508/\Delta 508$ i 36-letniego mężczyznę o genotypie $\Delta F508/G551D$. W chwili pisania tej pracy niewiele wiadomo o wynikach prowadzonych badań. Stwierdzenie wzrostu przewodnictwa jonów w komórkach nabłonkowych (odbudowa funkcji białka CFTR jako kanału chlorkowego) u poddanych terapii osób, w programie J. W e l s h a, było obiecującym sygnałem [44]. Z drugiej strony w projekcie kierowanym przez R. C r y s t a l a wstrzymanie terapii u jednej z osób z powodu zapalenia płuc wskazuje na problemy jakie mogą towarzyszyć podjętej metodzie terapeutycznej.

W projekcie kierowanym przez B. W i l l i a m s o n a (Londyn) i D. P o r t e o u s a z Edynburga zastosowano metodę liposomową. Terapii poddano grupę dziewięciu chorych na mukowiscydozę a liposomy z cDNA genu CFTR wprowadzono donosowo. Zagwarantowanie praw chorych nadzorowane jest przez specjalnie wyznaczoną osobę o uznanym autorytecie naukowym. Po zakończeniu programu rozszyfrowane zostanie, kto otrzymywał liposomy z funkcjonalnym genem, a kto placebo.

IV. Nowe koncepcje terapeutyczne

Leczenie mukowiscydozy w dalszym ciągu pozostaje leczeniem objawowym. Ewentualne wprowadzenie do praktyki lekarskiej somatycznej terapii genowej jest tylko nowym, nie zmieniającym jednak istoty leczenia, elementem. Jak się przewiduje w najbliższej dekadzie terapia właściwych dla mukowiscydozy zmian chorobowych ze strony układu oddechowego przebiegać będzie w trzech płaszczyznach: zwalczania infekcji bakteryjnych, ewakuacji śluzu zalegającego drogi oddechowe i kierunkowego dostarczania białka CFTR na drodze terapii genowej bądź też jego aktywacja w tych przypadkach, w których jest to możliwe. Trudno przypuszczać, że stosowany w wyjątkowych przypadkach zaawansowanej mukowiscydozy przeszczep płuc, czy płuc i serca był rutynowym zabiegiem terapeutycznym.

Na uwagę zasługują nowe metody farmakologiczne stosowane w leczeniu mukowiscydozy [10]. Upłynianie śluzu zalegającego drogi oddechowe a co za tym idzie jego lepsze wydalanie, osiąga się podając chorym amilorid czy rekombinacyjną ludzką DNazę. Amilorid, diuretyk blokując pobieranie jonów sodowych, przyczynia się do większego uwodnienia śluzu. DNaza, podawana podobnie jak amilorid, w postaci aerozolu trawi pochodzący z leukocytów DNA — istotny element wpływający na zwiększenie lepkości śluzu [45]. Innymi, poza DNazę, bioproduktami uzyskany-

mi dzięki technologii rekombinowania DNA, znajdującymi zastosowanie w leczeniu chorych na mukowiscydozę są inhibitory proteaz. Podawana w aerozolu ludzka α_1 antytrypsyna zmniejsza stan zapalny dróg oddechowych obniżając jednocześnie poziom enzymów proteolitycznych (szczególnie wolnej neutrofilowej elastazy) [46]. Wykazano również, że przywrócenie u chorych na mukowiscydozę przepływu jonów chlorkowych można osiągnąć indukując inny niż CFTR kanał chlorkowy. Czynnikiem indukującym są ATP i UTP.

Ciekawe implikacje kliniczne wydaje się mieć wykazanie, że defekt spowodowany mutacją $\Delta F508$ polega na nieosiąganiu przez polipeptyd właściwej lokalizacji w komórce. Prawidłowe funkcjonowanie zmutowanego białka CFTR jako kanału chlorkowego daje się przywrócić po obniżeniu temperatury reakcji z 37°C do 26°C [48]. W przypadku stwierdzenia mutacji $\Delta F508$ zaleca się więc stosowanie inhalacji np. zimnym powietrzem.

Postęp w biologii molekularnej jest bardzo szybki a metody coraz doskonalsze. Możliwa jest na przykład identyfikacja mutacji w genie CFTR w przypadku gdy „materiałem” do badań jest pojedyncza komórka blastomeru [48]. Pytanie o możliwość terapii genowej na poziomie zarodka także w świetle innych ogłoszonych niedawno osiągnięć naukowych, przestaje się więc mieć znaczenie tylko teoretyczne [49]. Trudno obecnie przewidzieć jakie będą decyzje społeczności naukowej. Wydaje się jednak, że większe znaczenie w przypadku niektórych chorób genetycznie uwarunkowanych będzie miała w dalszym ciągu profilaktyka pierwotna, badania przesiewowe i poradnictwo genetyczne. Przykładem skuteczności takich działań mogą być zainicjowanie w 1970 r. badania przesiewowe w chorobie Tay-Sachsa i β -talasemii. Niewątpliwym skutkiem uzyskiwania w ten sposób informacji przez rodziny ryzyka genetycznego, zarówno w chorobie jak i nosicielstwie zmutowanego genu, była 20-krotna redukcja występowania obu chorób w populacji [50].

Ostatnio szereg autorytetów z dziedziny badań nad mukowiscydożą zwróciło się do społeczności naukowej z programem podjęcia badań przesiewowych w rodzinach ryzyka mukowiscydozy [51].

IV. Zakończenie

W wieloletnich badaniach nad mukowiscydożą okres ostatni wydaje się być najbardziej owocny. W odstępach czteroletnich zlokalizowano gen CFTR w chromosomie 7 [1985], dokonano jego klonowania [1989] i rozpoczęto terapię genową [1993]. Przedstawione w artykule osiągnięcia ostatnich lat, dla około 50 tys. ludzi na świecie chorych na mukowiscydozę stanowią podstawę nadziei.

*Artykuł otrzymano 3 stycznia 1994 r.
Zaakceptowano do druku 25 lutego 1994 r.*

Podziękowanie

Chciałbym podziękować doc. dr hab. med. T. Mazurczakowi za cenne uwagi, które pomogły mi w napisaniu tej pracy.

Pracę wykonano w ramach projektu badawczego Nr 4S405 01304 finansowanego przez Komitet Badań Naukowych.

Piśmiennictwo

- Bal J (1991) *Post Biochem* 37: 153-158
- Tyrakowski T (1993) *Post Biochem* 39: 25-32
- Dodet B (1993) *Trends Biotech* 11: 182-189
- Morral N, Nunes V, Casals T, Cobos N, Asensio O, Dapena J, Estivill X (1993) *Hum Mol Genet* 2: 677-681
- Tsui L-C (1992) *Trends Genet* 8: 392-398
- Morral N, Nunes V, Casals T, Chillon M, Gimenez J, Bertranpetit J, Estivill X (1993) *Hum Mol Genet* 2: 1015-1022
- Abeliovich D, Lavon IP, Lerer I, Cohen T, Springer C, Avital A, Cutting GR (1992) *Am J Hum Genet* 51: 951-956
- Ferec C, Audrezet MP, Mercier B, Guillermit H, Moullier P, Quere I, Verlingue C (1992) *Nature Genet* 1: 188-191
- Rozen R, Brackeleer De M, Daigneault J, Ferreira-Rajabi L, Gerdes M, Lamoureux L, Aubin G, Simard F, Fujiwara TM, Morgan K (1992) *Am J Med Genet* 42: 360-364
- Collins FS (1992) *Science* 256: 774-779
- Tizzano EF, Buchwald M (1992) *J Pediat* 120: 337-349
- Anguiano A, Oats RD, Amos JA, Dean M, Gerard B, Stewart C, Maher TA, White MB, Milunsky A (1992) *JAMA* 267: 1794-1797
- Hirsh A, Williams C, Williamson V (1993) *Lancet* 342: 118
- Tabcharani JA, Rommens JM, Hou Y-X, Chang X-B, Tsui L-C, Riordan JR, Hanrahan JW (1993) *Nature* 366: 79-82
- Jiang C, Fibkbeiner WE, Widdicombe JH, McCray Jr PB, Miller SS (1993) *Science* 262: 424-429
- Trezise EO, Buchwald M (1991) *Nature (Lond)* 353: 434-437
- Kartner N, Augustinas O, Jensen TJ, Naismith AL, Riordan JR (1992) *Nature Genet* 1: 321-327
- Trezise AED, Chambers JA, Wardle CJ, Gould S, Harris A (1993) *Hum Mol Genet* 2: 213-218
- Trapnell BC, Chu CS, Paakko Pk, Banks TC, Yoshimura K, Ferrans VJ, Chernick MS, Crystal RG (1991) *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 6565-6569
- Chu C-S, Trapnell BC, Curristin SM, Cutting GR, Crystal RG (1992) *J Clin Invest* 90: 785-790
- Whitsett JA, Budden A, Hull WM, Clark JC, O'Reilly MA (1992) *Nature Genet* 2: 13-20
- Trezise AED, Buchwald M, Hihhins F (1993) *Hum Mol Genet* 2: 801-802
- Delaney SJ, Rich DP, Thompson SA, Hargrave MR, Levelock PK, Welsh MJ, Wainwright BJ (1993) *Nature Genet* 4: 426-431
- Drumm ML, Pope HA, Cliff WH, Rommens JM, Marvin SA, Tsui L-C, Collins FS, Frizzel RA, Wilson JM (1990) *Cell* 62: 1227-1233
- Rich DP, Anderson MP, Gregory RJ, Cheng SH, Paul S, Jefferson DM, McCann JD, Klinger K W, Smith AE, Welsh MJ (1990) *Nature (Lond)* 347: 358-363
- Rosenfeld MA, Yoshimura K, Trapnell BC, Yoneyama K, Rosenthal ER, Dalemans W, Fukayama M, Bargon J, Stier LE, Stratford-Perricaudet L, Perricaudet M, Guggino WB, Pavarini A, Lecococq J-P, Crystal RG (1992) *Cell* 68: 143-155
- Carter BJ (1990) W: Handbook of Parvoviruses. Tijssen PL (red) CRC Press, Boca Raton 2: 247-284
- Hyde SC, Gill DR, Higgins CF, Trezise AED, MacVinish LJ, Cuthebert A W, Ratcliff R, Evens

- MJ, Colledge WH (1993) *Nature (Lond)* 362: 250-255
29. Findeis MA, Merwin JR, Spitalny GL, Chiou HC (1993) *Trends Biotech* 11: 202-205
30. Porteous DJ, Dorin JR (1993) *Trends Biotech* 11: 173-181
31. Kolberg R (1992) *Science* 256: 772-773
32. Smithies O (1993) *Trends in Genet* 9: 112-117
33. Ratcliff R, Evens MJ, Cuthbert A W, MacVinish LJ, Foster D, Anderson JR, Colledge WH (1993) *Nature Genet* 4: 35-41
34. Snouwaert JN, Brigman KK, Latour AM, Malouf NN, Boucher RC, Smithies O, Koller BH (1992) *Science* 257: 1083-1088
35. Dorin JR, Dickonson P, Alton EFWF, Smith SN, Geddes DM, Stevenson BJ, Kimber WL, Fleming S, Clarke AR, Hooper ML, Anderson L, Beddington RSP, Porteous DJ (1992) *Nature (Lond)* 359: 211-215
36. Porteous DJ, Alton EFWF, Dorin JR (1993) *Pediat Pulmonol Sup* 9: 136-137
37. Imler J-L, Bout B, Perricaudet M, Baskin G, Scholte B, Pavirani A, Valerio D (1993) W: Escobar H, Baquero F, Suarez K (red) Clinical ecology of cystic fibrosis. Excerpta Medica, Amsterdam, London, New York, Tokyo str 21-27
38. Engelhardt J, Simon R, Zependa M, Yang Y, Wilson JM (1993) *Pediat Pulmonol Sup* 9: 184
39. Rosenfeld MA, Siegfried W, Yoshimura K, Yoneyama K, Fukayama M, Stier LE, Paakko PK, Gilardi P, Stratford-Perricaudet L, Perricaudet M, Jallat S, Pavarini A, Lecococq J-P, Crystal RG (1992) *Science* 252: 431-434
40. Engelhardt JF, Yang Y, Starford-Perricaudet LD, Allen ED, Kozarsky K, Perricaudet M, Yankaskas JR, Wilson JM (1993) *Nature Genet* 4: 27-34
41. Caplen NJ, Middleton PS, Kasschau KD, Miller AD, Fasold KI, Alton EFWF, Geddes DM, Coustelle C, Williamson R (1993) W: Escobar H, Baquero F, Suarez L (red) Clinical ecology of cystic fibrosis. Excerpta Medica, Amsterdam, London, New York, Tokyo str 33-36
42. Alton EFWF, Middleton PG, Caplen NJ, Smith SN, Steel DM, Munkonge FM, Jeffery PK, Geddes DM, Hart SL, Williamson R, Fasold KI, Miller AD, Dickinson P, Stevenson BJ, McLachan G, Dorin JR, Porteous DJ (1993) *Nature Genet* 5: 135-142
43. Flotte TR, Conrad C, Afione SA, Solow R, Zeitlin PL, Gugino WB, Carter BJ (1993) *Pediat Pulmunol Sup* 9: 74-75
44. Zebner J, Couture LA, Gregory RJ, Graham SM, Smith AE, Welsh MJ (1993) *Cell* 75: 207-216
45. Ranasinha C, Assoufi B, Christiansen D, Fuchs H, Empey D, Geddes D, Hodson M (1993) *Lancet* 342: 199-202
46. McElvaney NG, Hubbard RC, Birrer P, Chernick MS, Caplan DB, Frank MM, Crystal RG (1991) *Lancet* 337: 392-394
47. Young Y, Devor DC, Engelhardt JF, Ernst SA, Strong TV, Collins FS, Cohn JA, Frizzell RA, Wilson JM (1993) *Hum Mol Genet* 2: 1253-1261
48. Liu J, Lissens W, Devroey P, Steirteghen Van A, Liebaers I (1992) *Lancet* 339: 1190-1192
49. Wivel NA, Walters L (1993) *Science* 262: 533-538
50. Caskey CT (1993) *Science* 262: 48-49
51. Statement of the American Society of Human Genetics on Cystic Fibrosis Carrier Screening 51: 1443-1444

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

Niekonwencjonalne strategie ochrony roślin przed infekcjami wirusowymi

Non-conventional strategies to protect plants against viral infections

DANUTA HULANICKA¹,
ANDRZEJ PAŁUCHA²,
WŁODZIMIERZ ZAGÓRSKI³

Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Strategie stosowane w walce z infekcjami wirusów roślinnych
 - II-1. Wprowadzenie do genomu rośliny genu białka płaszczka (CPMP)
 - II-2. Wprowadzenie do genomu roślinnego niestrukturalnych genów wirusowych (RMP)
 - II-3. Konstrukcje antysensownych RNA
 - II-4. Wykorzystanie wirusów satelitarnych
 - II-5. Wykorzystanie defektywnych interferujących cząsteczek kwasów nukleinowych wirusa (DI)
 - II-6. Zastosowanie rybozymów

Wykaz stosowanych skrótów: BP — białko płaszczka; CPMP — oporność warunkowana obecnością białka płaszczka (ang. *coat protein mediated protection*); RMP — oporność warunkowana obecnością replikazy (ang. *replicase mediated protection*); DI — defektywne interferujące cząsteczki kwasów nukleinowych wirusa (ang. *defective interfering viral nucleic acids*); ORF — otwarta ramka odczytu (ang. *open reading frame*).

I. Wstęp

Klasyczne obserwacje dotyczące replikacji defektywnych wirusów wskazywały, że ich namnażanie osłabia plon wirusa właściwego. W połowie lat osiemdziesiątych Sanford i Johnston [1] sformułowali hipotezę, zgodnie z którą zakłócenie replikacji wirusa może być obiecującą strategią walki z infekcjami wirusowymi.

Rozwój technik inżynierii genetycznej, a przede wszystkim otrzymanie roślin transgenicznych, otworzyło nowe możliwości w walce z patogenami roślin [2]. Oczywiście jest, że to podejście wymaga poznania

Contents:

- I. Introduction
- II. Non-conventional strategies to protect plants against viral infections
 - II-1. Introduction of coat protein gene (*coat protein mediated protection CPMP*)
 - II-2. Introduction of non-structural viral genes into plant genome (*replicase mediated protection, RMP*)
 - II-3. Antisense RNA
 - II-4. Application of satellite viruses
 - II-5. Application of defective interfering viral nucleic acids (DI)
 - II-6. Application of ribozymes

molekularnych mechanizmów cyklu życiowego wirusów. Mówiąc bardziej obrazowo, trzeba dobrze poznać cel, aby wiedzieć jaką broń zastosować. Stąd też badania podstawowe są niezbędnym etapem w pracach aplikacyjnych mających na celu zaplanowanie i wybranie strategii walki z infekcjami wirusowymi. Metody ochrony roślin przed infekcjami wirusowymi za pomocą tzw. obrony krzyżowej (ang. *cross-protection*) sprowadzają się do otrzymania transgenicznej rośliny zawierającej w swym genomie fragment wirusowego DNA, którego produkt zakłóca replikację wirusa.

II. Strategie stosowane w walce z infekcjami wirusowymi roślin

Od czasu ukazania się w 1986 r. pierwszej pracy [3] donoszącej o konstrukcji transgenicznej rośliny wykazującej zwiększoną oporność na infekcje wirusowe rozwinięto szereg nowych metod. Obecnie wyróżnić można następujące:

1. Wprowadzenie do genomu rośliny genu białka płaszczka (CPMP)
2. Wprowadzenie do genomu roślinnego niestrukturalnych genów wirusowych (RMP)
3. Konstrukcje antysensownych RNA
4. Wykorzystanie wirusów satelitarnych
5. Wykorzystanie defektywnych interferujących cząsteczek kwasów nukleinowych wirusa (DI)
6. Zastosowanie rybozymów

¹ Prof. dr hab., ² mgr, ³ prof. dr hab., Zakład Biosyntezy Białka, Zakład Biochemii Drobnoustrojów Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN, ul. Pawińskiego 5 A, 02-106 Warszawa.

II-1. Wprowadzenie do genomu rośliny genu białka płaszczka wirusa

Występowanie naturalnej obrony krzyżowej, tj. osłabienie objawów choroby wirusowej na skutek uprzedniej infekcji zbliżonym wirusem łagodnym, znane było od lat trzydziestych [4]. Ogólnie przyjętą hipotezą tłumaczącą zwiększenie oporności rośliny było założenie, że białko płaszczka wirusa łagodnego, obecne w roślinie na skutek wcześniejszej infekcji, hamuje odplaszczanie wirusa wnikającego do roślin w czasie wtórnej infekcji. Nic też dziwnego, że początkowo badania nad otrzymaniem opornych roślin transgenicznych polegały głównie na wprowadzaniu genu białka płaszczka (BP) do genomu rośliny. Od czasu pionierskiej pracy *Beachy i wsp.* w 1986 r. [3] donoszącej o otrzymaniu transgenicznego tytoniu, zawierającego w genomie gen BP wirusa mozaiki tytoniowej (TMV) i wykazującego zwiększoną oporność na infekcję tym wirusem, ukazało się szereg prac o konstrukcji roślin transgenicznych opornych na około 20 różnych wirusów [5-7]. Tego rodzaju oporność określamy jako obronę zależną od białka płaszczka CPMP (ang. *coat protein mediated protection*). Szereg faktów takich jak brak oporności w przypadku infekcji wirusowym RNA, czy zależność oporności od stopnia homologii aminokwasów w białkach płaszczka wirusa infekcyjnego i wirusa wprowadzonego do genomu rośliny, sugeruje, że BP jest istotnie odpowiedzialne za oporność. Trzeba jednak pamiętać, że niekiedy (między innymi w przypadku transgenicznych ziemniaków otrzymanych niezależnie w 3 ośrodkach i zawierających gen BP wirusa liściozwoju ziemniaka) [8-10] nie stwierdza się obecności BP w roślinie, a mimo to rośliny wykazują oporność na infekcję wirusem. Mechanizm tego rodzaju oporności nie jest w pełni poznany i wydaje się, że może być różny w przypadkach różnych wirusów.

Beachy [5], rozważając mechanizm obrony krzyżowej przyjmuje, że białko płaszczka jest odpowiedzialne za ochronę rośliny. Wysuwa przy tym dwie hipotezy: pierwsza zakłada obecność receptorów BP, które są zablokowane przez BP produkowane przez transgeniczny fragment DNA, druga zaś sugeruje, że zostaje zaburzona równowaga między BP wirusa infekcyjnego a BP produkowanym przez transgeniczny fragment DNA; BP produkowane w roślinie zakłóca równowagę i utrudnia odplaszczanie wirusa. Biorąc pod uwagę ograniczenie rozprzestrzenienia się wirusa w roślinie (ang. *systemic spread*) wydaje się jednak, że mechanizm obrony jest bardziej złożony. Lepsze poznanie tego mechanizmu może umożliwić konstrukcję transgenicznych roślin o wyższym stopniu oporności.

II-2. Wprowadzenie do genomu roślinnego nie-strukturalnych genów wirusowych

Jak to często bywa w nauce, przypadek zdecydował

o powstaniu nowej strategii w walce z infekcjami wirusowymi. Grupa *Zaitlina* z Cornell University, Ithaca, USA zajmuje się od lat replikazami wirusowymi. W laboratorium tym otrzymano oporne rośliny transgeniczne zawierające zintegrowany z chromosomem gen kodujący podjednostkę wirusowej replikazy RNA. W trakcie badań nad replikazą TMV otrzymano transgeniczny tytoń, zawierający gen białka 54K, którego produkt stanowi prawdopodobnie składnik kompleksu replikazy wirusa [11, 12]. Celem tych doświadczeń było sprawdzenie czy produkt transgeny (białko 54KDa) może umożliwić replikację wirusa z mutacją w genie 54K. Przypadkowo okazało się, że otrzymany transgeniczny tytoń, zawierający gen 54K, jest oporny na infekcję wirusem TMV, a stopień oporności jest znacznie wyższy niż uzyskany w wyniku wprowadzenia genu BP. Oporność tę nazywamy ochroną zależną od replikazy -RMP (ang. *replicase mediated protection*). Oporność RMP wywołana przez integrację genu 54K, różni się znacznie od oporności uzyskanej przez wprowadzenie genu BP. Występuje ona niezależnie od tego czy infekcję rośliny przeprowadza się wirionem czy wirusowym RNA. Ponadto, oporność pojawia się nawet przy stosowaniu wysokich dawek wirusa (inokulum 0,5—1,0 mg wirusa/ml).

Dalsze badania *Zaitlina* i *wsp.* wykazały, że RMP nie jest spowodowana brakiem rozprzestrzeniania się wirusa, lecz silną represją (20 do 80 krotną) jego replikacji [13]. Używając protoplastów otrzymanych z roślin transgenicznych i kontrolnych, *Zaitlin* wykazał, że nie zachodziło namnażanie się wirusa w protoplastach z roślin transgenicznych, a zatem oporność jest wynikiem zahamowania replikacji wirusa w komórce a nie braku rozprzestrzeniania się wirusa. Stosując sondy RNA homologiczne do (+) i (-) RNA TMV wykazano syntezę śladowych ilości nici (+) i (-) TMV RNA co sugerowało, że białko 54KD może być syntetyzowane, chociaż nie udało się tego stwierdzić metodą immunologiczną. Dalsze doświadczenia potwierdzają przypuszczenie, że to jednak białko 54KD jest odpowiedzialne za oporność. *Carri i wsp.* [14] wprowadzali do protoplastów tytoniu jednocześnie RNA wirusa TMV i plazmid zawierający nienaruszony gen 54K lub jego zmodyfikowaną wersję. W przypadku transfekcji plazmidem z pełnym genem 54K lub jego delecyjnym mutantem (którego produkt nie zawierał pierwszych 14 N-końcowych aminokwasów) wydajność replikacji wirusa była znacznie obniżona. Natomiast, jeśli do transfekcji użyto mutantu produkującego tylko fragment (20% cząsteczki) białka dzikiego, tempo replikacji infekującego wirusa nie odbiegało od kontroli.

Mimo intensywnych prac nad procesem RMP, jej mechanizm pozostaje nieznan. Dopiero opracowanie metody replikacji *in vitro* wirusa TMV umożliwi stwierdzenie czy to białko 54KD, czy też RNA transgeny odpowiedzialne są za występowanie oporności. Na razie można wysuwać jedynie hipotezy. Jedną

z nich przyjmuje, że właśnie RNA transgenu jest odpowiedzialne za niewrażliwość na infekcję wirusową i zakłada, że syntetyzowany RNA wiążąc się z nicią (–) RNA wirusa utrudnia jego replikację. Hipoteza ta jest podobna do hipotezy proponowanej przez *M o r c h i w s p.* [15], według której syntetyczny oligonukleotyd zakłóca wiązanie replikazy, utrudniając namnażanie wirusa.

Inne hipotezy przypisują zasadniczą rolę samemu białku 54KD lub jego fragmentowi, które mogą utrudniać proces powstawania aktywnego kompleksu replikującego.

Doniesienie o konstrukcji transgenicznego tytoniu, opornego na infekcję wirusową w wyniku wprowadzenia genu kodującego podjednostkę replikazy, wzbudziło duże zainteresowanie.

Wkrótce opublikowano informacje o transgenicznych roślinach zawierających geny replikaz innych wirusów [16, 17].

Zespół *D a v i e s a* z John Innes Institute w Anglii od paru lat pracuje nad badaniem wirusa wczesnego brązowienia grochu (PEBV). PEBV zaliczamy do grupy tobrawirusów [16]. Genom tych wirusów składa się z dwóch niezależnych nici (+) RNA, RNA I koduje dwa białka replikazy, 141KD i 201KD, które wykazują homologię do białek 123 i 183 KD TMV. Białko 201 KD, analogicznie jak białko 183 KD TMV, jest syntezowane w wyniku supresji zlokalizowanego w regionie 3' końca RNA I kodonu stop UGA i również zawiera wewnętrzną ramkę odczytu (ORF). W ramce tej występuje motyw aminokwasowy homologiczny z odpowiednim motywem w białku 54KD wirusa TMV. To podobieństwo nasunęło pomysł sprawdzenia czy wprowadzenie do rośliny cDNA kodującego ten region wywoła oporność na infekcję. W rezultacie otrzymano transgeniczny tytoń *Nicotiana benthamiana*, oporny na wysokie miana wirusa PEBV w inokulum. Charakterystyka uzyskanej RMP była podobna do opisanej przez grupę *Z a i t l i n a* dla wirusa TMV. RMP występowała zarówno przy zakażeniach wirionem jak i wirusowym RNA i nie zniknęła po zastosowaniu wysokich dawek inokulum.

Wprowadzenie do rośliny genu białka 54KD wirusa PEBV, z mutacją powodującą przedwczesną terminację translacji, nie powodowało oporności. Wynik ten sugeruje bezpośredni udział białka w powstawaniu oporności. Zaobserwowano, że wielokrotne zakażenie rośliny transgenicznej wirusem PEBV prowadzi do pojawienia się ponownej wrażliwości na infekcję, następuje zatem przełamanie bariery oporności. Wyizolowanie mutantów PEBV i ich zsekwencjonowanie pozwoli na uzyskanie informacji, które regiony białka są zaangażowane w powstawaniu oporności.

Zarówno TMV jak PEBV mają podobną organizację i ekspresję genomu; w przypadku obu wirusów w jednej z podjednostek replikazy występuje wewnętrzna ramka odczytu (ORF) zawierająca informacje o białku z sekwencją GDD, charakterystyczną dla

replikaz.

Interesującym byłoby sprawdzenie, czy można uzyskać RMP dla wirusów o innej organizacji genomu niż TMV czy PEBV np. dla wirusa mozaiki ogórka (CMV). Wirus ten jest patogenem o dużym znaczeniu ekonomicznym ponieważ atakuje szereg roślin uprawnych. Genom wirusa CMV składa się z trzech podjednostek (+) RNA. RNA1 i RNA2 kodują podjednostki replikazy 111KD i 97KD. W białku 97KD kodowanym przez RNA2 występują sekwencje aminokwasowe (GDD) charakterystyczne dla polimerazy RNA zależnej od RNA. Fragment genu 97KD zawierający domeny replikazy wprowadzono do tytoniu. Transgen nie zawierał pełnej sekwencji replikazy, mimo to otrzymany transgeniczny tytoń charakteryzował się RMP o własnościach analogicznych do uzyskanych po wprowadzeniu genu 54K wirusa TMV czy PEBV, (RMP występowała nawet przy inokulum o wysokim mianie wirusa, niezależnie od tego czy infekcję przeprowadzano wirionem czy RNA wirusowym).

Nad otrzymaniem transgenicznego tytoniu zawierającego sekwencje ORF1 wirusa PVX pracowały niezależnie dwa ośrodki. *B r a u n i H e m e n w a y* [18] wprowadzili do tytoniu pełną sekwencję ORF1 (a także różne jej fragmenty), kodującą białko 165KD zawierające sekwencje aminokwasowe charakterystyczne dla polimeraz RNA. RMP występuje zarówno w roślinie zawierającej pełną kopię genu białka 165KD, jak również w roślinie zawierającej fragment genu odpowiadający N-końcowej części białka, bez sekwencji charakterystycznych dla replikaz. Natomiast rośliny zawierające część środkową genu, kodującą fragmenty wiążące nukleotydy, czy też część C-terminalną z sekwencją GDD nie były odporne na infekcję.

Nieco inne wyniki otrzymała grupa z John Innes Institute, Anglia [19], co z pewnością utrudnia interpretację uprzednio omówionych danych. Wprowadzili oni do tytoniu mutanty genu białka 165KD ze zmienioną sekwencją GDD. Sekwencja GDD jest niezbędna dla aktywności szeregu replikaz RNA jak i replikaz fagowych [20]. Założono, że powstające w komórce zmutowane białko może zakłócać replikację wirusa. Wykazano, że zmiana sekwencji GDD na GAD, GED lub ADD powoduje kompletne zablokowanie infekcji wirusowej [19]. Niestety praca ta nie zawiera danych o oporności rośliny zawierającej niezmienną sekwencję GDD, co utrudnia porównanie wyników obu grup badaczy. O ile *B a u l c o m b e* i w s p. [19] stwierdzili obecność zmutowanego białka 165KD w roślinie, to *B r a u n i H e m e n w a y* [18] wykryli jedynie transkrypt wprowadzonego genu. Trzeba pamiętać, że wykrycie produktów transgenu jest często trudne, prawdopodobnie z powodu szybkiego rozkładu powstającego białka albo z powodu integracji transgenu w mało aktywny transkrypcyjnie region genomu rośliny. A więc, nie stwierdzenie obecności poszukiwanego białka nie jest równoznaczne z brakiem translacji

mRNA transgenu.

Podsumowując, można zaproponować następującą hipotezę dotyczącą mechanizmu działania RMP.

1. Kodowane przez transgen białko zakłóca regulację replikacji, np. zmieniając równowagę między wirusowymi niciami (+) i niciami (-). Funkcja takiego regulatora jest przypisywana białku 54KD wirusa TMV, chociaż do tej pory tego nie udowodniono [12].
2. Syntetyzowana konstytutywnie w roślinie zmutowana replikaza współzawodniczy z aktywnym białkiem wirusowym w tworzeniu kompleksu replikacyjnego co prowadzi do powstania nieaktywnego kompleksu. Ten hipotetyczny mechanizm, polegający na wykluczeniu czynności genu wirusowego przypomina hipotezę H e r s k o w i t z'a o tzw. negatywnej dominacji mutanta [21] zgodnie z którą nadprodukcja zmutowanej podjednostki powoduje inaktywację aktywnego kompleksu.
3. Syntetyzowane białko aktywne lub zmutowane „wylapuje” w komórce kofaktory niezbędne w procesie replikacji, hamując w ten sposób namnażanie się wirusa.
4. Transgeniczny transkrypt tworzy dupleks z komplementarnym wirusowym RNA co uniemożliwia replikację.

Są to na razie tylko hipotezy. Sprawdzenie, który z omówionych mechanizmów jest rzeczywiście odpowiedzialny za RMP, będzie możliwe dopiero po opracowaniu układów replikacji wirusów *in vitro*. Warto podkreślić, że transformacja roślin fragmentami cDNA wirusów zawierających geny replikazy może wywoływać obniżenie lub zahamowanie namnażania się wirusa. Ta strategia umożliwiła otrzymanie opornych roślin transgenicznych.

II-3. Konstrukcje antysensownych RNA

Zastosowanie tzw. antysensownego RNA, czyli RNA komplementarnego wobec genomu wirusa, jest jedną z możliwych strategii w walce z infekcjami wirusowymi [22]. Jednak, jak dotąd, efekty tego podejścia są niewielkie. Wynika to prawdopodobnie z następujących powodów:

1. Większość wirusów roślinnych namnaża się w cytoplazmie, natomiast antysensowny RNA powstaje w jądrze i aby mogło dojść do parowania obu rodzajów RNA, musi on przedostać się do cytoplazmy. Antysensowny RNA może przy tym ulegać degradacji zanim dotrze do „docelowego” RNA wirusowego.
2. W procesie tworzenia kompleksu RNA-RNA ważny jest stosunek ilościowy cząsteczek RNA obu typów. Stężenie antysensownego RNA może nie być wystarczające, aby unieczynnić szybko powstający RNA wirusowy.

Większość opublikowanych prac dotyczy wprowa-

żenia genu białka płaszczka w orientacji antysensownej [23-25], zarówno w przypadku wirusa PLRV [26, 27] jak i wirusa PVX oporność nie była wysoka i występowała jedynie przy niskich stężeniach inokulum [24, 28]. Prawdopodobnie lepsze wyniki, czyli większą oporność na infekcje, można będzie uzyskać w przypadku wirusów, których replikacja przebiega w jądrze komórek roślinnych (np. *Geminivirus*, czy *Caulimovirus*). Przemawiają za tym wyniki pracy opublikowanej niedawno [29], w której autorzy opisują otrzymanie transgenicznego pomidora opornego na infekcję wirusem *Tomato Golden Mosaic Virus* (TGMV), w wyniku integracji do genomu gospodarza wirusowego genu ALI w orientacji antysensownej. Autorzy obserwowali pozytywną korelację między stężeniem antysensownego RNA powstającego w roślinie a stopniem oporności.

Zainteresowanych czytelników odsyłamy do niedawno opublikowanego artykułu przeglądowego na temat zastosowania antysensownego RNA w zwalczaniu infekcji wirusowych [22].

II-4. Wykorzystanie wirusów satelitarnych

Satelitarne RNA (sat RNA) są to małe cząsteczki RNA wymagające do replikacji obecności wirusa pomocniczego (ang. *helper virus*) [30]. Niejednokrotnie obserwowano, że obecność sat RNA w wirusie infekującym powodowała atenuację objawów zakażenia [31, 32]. Obserwacja ta sugerowała możliwość zwiększenia oporności rośliny przez wprowadzenie cDNA zawierającego informację o sat RNA do genomu. Zastosowanie tej strategii walki z infekcjami wirusowymi jest możliwe tylko w przypadkach wirusów niosących sat RNA. Z tego powodu, jak również wobec ryzyka powstania bardziej zjadliwej formy sat RNA [34], metoda ta nie znalazła szerokiego zastosowania.

Mechanizm działania sat RNA jest właściwie nieznan, a poznanie go mogłoby ułatwić szersze zastosowanie transgenów sat RNA. Jeżeli np. udało się stwierdzić, które sekwencje w sat RNA powodują redukcję replikacji wirusa bez możliwości oplaszczenia w kapsydzie wirusa pomocniczego, można by uniknąć niebezpieczeństwa zwiększenia wirulencji.

Konstrukcję transgenicznych roślin, zawierających cDNA dla sat RNA przeprowadzono w przypadku dwóch wirusów CMV i kulistej plamistości tytoniu (ang. *Tobacco Ringspot Virus*) [32-34]. W przypadku obu transgenicznych roślin obserwowano zmniejszenie objawów chorobowych po infekcji wirusami pomocniczymi. Ciekawe, że obecność cDNA sat RNA CMV zapewniała również ochronę przeciw infekcji pokrewnym wirusem sterylności pomidora (ang. *Tomato Aspermy Virus*) mimo, że nie obserwowano zmniejszenia replikacji infekującego wirusa. Jak już wspomniano wyżej, mechanizm działania sat RNA jest nieznan, ale ogólnie przyjęto hipotezę, że sat RNA zakłóca replika-

II-5. Wykorzystanie defektywnych interferujących cząsteczek kwasów nukleinowych wirusa (DI)

Defektywne interferujące cząsteczki RNA (DI) występują w niektórych wirusach zwierzęcych [35], a ostatnio znaleziono je także w wirusach roślinnych grupy *Tombusvirus* i *Carmovirus* [36, 37]. DI są to cząstki RNA, które wymagają do namnażania obecności wirusa rodzicielskiego, powstają zaś w wyniku delekcji fragmentów genomu wirusa rodzicielskiego. Podobnie jak sat RNA, obecność DI może intensyfikować lub zmniejszać objawy chorobowe wywołane infekcją wirusa rodzicielskiego. Prawdopodobnie jest to wywoływane zakłócaniem procesu replikacji. Obserwacja ta nasunęła myśl zastosowania DI w walce z infekcjami.

Stanley [38] opisał wykorzystanie naturalnych DI do otrzymania transgenicznej rośliny, w której zachodziła ekspresja subgenomowego DNA B wirusa afrykańskiej mozaiki kassawy (ang. *Africana Cassava Mosaic*). Ekspresja tego fragmentu prawdopodobnie zakłócała replikację DNA A i B, co powodowało zwiększenie oporności na infekcje tym wirusem, ale nie ograniczało infekcji innym geminiwirusem.

Naturalne DI występują w niewielu wirusach roślinnych. Ostatnio stwierdzono, że delecyjne mutanty RNA-2 wirusa mozaiki stokłosa (BMV) redukują, a nawet eliminują namnażanie się RNA-1 i RNA-2; (RNA-1 i RNA-2 kodują białka produktów związanych z replikacją BMV) [39]. Te delecyjne mutanty BMV występują rzadko i zostały zidentyfikowane niedawno.

II-6. Zastosowanie rybozymów

Zastosowanie rybozymów, czyli małych cząsteczek RNA zdolnych do katalitycznego cięcia charakterystycznych sekwencji RNA, jest nową strategią w walce z infekcjami wirusowymi. Jeden z typów rybozymów charakteryzuje się obecnością struktury "hammerhead". Sekwencje rozpoznawane przez rybozymy są to: GUN, gdzie N może być C, lub w mniejszym stopniu, U i A. Warunkiem katalitycznego cięcia RNA, poza konserwowaną sekwencją GUN, jest homologia pomiędzy sekwencjami ograniczającymi GUN i sekwencjami ramion rybozymu. Ponieważ jedynie sekwencja GUN w RNA jest niezbędna dla zajścia katalitycznego cięcia, można zaprojektować syntetyczny rybozym, którego ramiona będą wykazywały homologię do regionów otaczających dowolny triplet GUN. Haseloff i Gerlach [40] skonstruowali trzy rybozymy, które *in vitro* cięły specyficzne mRNA acetylotransferazy chloramfenikolu w trzech różnych miejscach za tripletem GUC. Dalsze prace miały na celu opracowanie optymalnych warunków reakcji oraz

konstrukcję bardziej aktywnych rybozymów [41]. W rok później ukazała się praca [42] donosząca o konstrukcji dwóch rybozymów, które *in vitro* przeprowadzały cięcie nici (+) RNA w regionie białka płaszczka i polimerazy RNA PLRV. Sekwencje DNA zawierające informacje o syntezie rybozymów podłączano pod promotor T7, a enzymatycznie aktywny transkrypt otrzymywano w wyniku transkrypcji *in vitro*. Otrzymane rybozymy przeprowadzały reakcję zarówno z RNA PLRV, izolowanym z wirionu, jak również z transkryptem otrzymanym po podłączeniu wybranych regionów wirusowego cDNA pod promotor T7.

Przedstawione powyżej strategie są przykładem nowego podejścia w walce z infekcjami wirusowymi. Wprowadzenie tych metod stało się możliwe dzięki rozwojowi szeregu dyscyplin naukowych, takich np. jak klasyczna wirusologia czy biologia molekularna.

Z całą pewnością, w miarę rozwoju naszej wiedzy o wirusach, rozwijane będą nowe strategie walki z powodowanymi przez nie infekcjami.

Artykuł otrzymano 16 lutego 1994 r.
Zaakceptowano do druku 4 marca 1994 r.

Piśmiennictwo

1. Sanford JC, Johnston SA (1985) *J theor Biol* **113**: 395-405
2. Baulecombe D (1989) *TIG* **5**: 56-60
3. Powell-Abel PA, Nelson RS, De B, Hoffman N, Rogers SG, Fraley RT, Beachy RN (1986) *Science* **232**: 738-743
4. Valle R, Skrzeczkowski J, Morch MD, Joshi R, Gargouri R, Drugeon G, Boyer J, Chapeville F, Haenni AL (1988) *Biochem* **70**: 695-703
5. Beachy RN, Loesch-Fries S, Tumer NE (1990) *Ann Rev Phytopathol* **28**: 451-474
6. Nelson RS, Powell-Abdel P, Beachy RN (1987) *Virology* **158**: 126-132
7. Cuzzo M, O'Connell KM, Kaniewski W, Fang R-X, Chua N-H, Tumer NE (1988) *Bio/Technology* **6**: 549-557
8. Kawchuk LM, Martin RR, Mc-Pherson J (1991) *Mol Plant Microbe Interact* **4**: 247-253
9. van der Wilk F, Posthumus-Lutke Willink D, Huisman MJ, Huttinga H, Goldbach G (1991) *Plant Mol Biol* **17**: 431-439
10. Barker H, Reavy B, Kumar A, Webster KD, Mayo MA (1992) *Ann appl Biol* **120**: 55-64
11. Golemboski DB, Lomonosoff GP, Zaitlin M (1990) *Proc Natl Acad Sci USA* **87**: 6311-6315
12. Lomonosoff GP (1993) w druku.
13. Carr JP, Zaitlin M (1991) *Mol Microbe Interact* **4**: 579-585
14. Carr JP, Marsh LE, Lomonosoff GP, Sekiya ME, Zaitlin M (1992) *Mol Plant Microbe Interact* **5**: 397-404
15. Morch M-D, Joshi RL, Denial TM, Haenni A-I (1987) *Nucleic Acids Res* **15**: 4123-4130
16. MacFarlane SA, Davies JW (1992) *Proc Natl Sci USA* **89**: 5829-5833
17. Anderson JM, Palukaitis P, Zaitlin M (1992) *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 8759-8763
18. Braun CJ, Hemenway CL (1992) *Plant Cell* **4**: 735-744
19. Longstaff M, Brigneti G, Boccard F, Chapman S, Baulcombe D (1993) *EMBO J* **12**: 379-386

20. Inokuch Y, Hirashima A (1990) *J Biochem* **108**: 53-58
21. Herskowitz I (1987) *Nature* (Lond) **329**: 219-222
22. Bejarano ER, Lichtenstein CP (1992) *Tibtech* **10**: 383-388
23. Cuzzo M, O'Connell KM, Kaniewski W, Frang RX, Chua NH, Turner NE (1988) *Bio Technology* **6**: 549-557
24. Hemenway C, Fang RX, Kaniewski WK, Chua NH, Turner NE (1988) *EMBO* **7**: 1273-1280
25. Powell PA, Stark DM, Sanders PR, Beachy RN (1989) *Proc Natl Acad Sci USA* **86**: 6949-6952
26. Kawchuk LM, Martin RR, McPherson J (1991) *Mol Plant Microbe Int* **4**: 247-253
27. van der Wilk F, Willink DPL, Huisman MJ, Huttinga H, Goldbach R (1991) *Plant Mol Biol* **17**: 431-439
28. Powell-Abel P, Stark DM, Sanders PR, Beachy RN (1989) *Proc Natl Acad Sci USA* **86**: 6949-6952
29. Day AG, Bejarano E, Buck KW, Burrell M, Lichtenstein CP (1991) *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 6711-6715
30. Roossinck MJ, Sleat D, Palukaitis P (1992) *Mic-
robiol Rev* **56**: 265-279
31. Baulcombe DC, Saunders GR, Bevan MW, Mayo MA, Harrison BD (1986) *Nature* (Lond) **321**: 446-449
32. Gerlach WL, Llewellyn D, Haseloff J (1987) *Nature* (Lond) **328**: 802-805
33. Ponz F, Rowhani A, Mircetich SM, Bruening G (1987) *Virology* **160**: 183-190
34. Kurath G, Palukaitis P (1989) *Mol Plant Microbe Interact* **2**: 91-96
35. Ismael ID, Milner JJ (1988) *J gen Virol* **69**: 999
36. Burgyan J, Grieco F, Russo M (1989) *J Gen Virol* **70**: 235-239
37. Li X, Heaton LA, Morris TJ, Simon AE (1989) *Proc Natl Acad Sci USA* **86**: 9173-9177
38. Stanley J, Frischmuth T, Ellowood S (1990) *Proc Natl Acad Sci* **87**: 6291
39. Marsh LE, Pogue GP, Connell JP, Hall TC (1991) *J Gen Virol* **72**: 1787
40. Haseloff J, Gerlach WL (1988) *Nature* **334**: 585-591
41. Gerlach WL, Haseloff J, Perriman R, Graf L (1989) *J Cell Biochem [Suppl]* **13D**: 245
42. Lamb JW, Hay RT (1990) *J Gen Virol* **71**: 225

Cytoplazmatyczne białka motoryczne

Cytoplasmic motor proteins

RENATA DĄBROWSKA*

Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Nadrodzina miozyny
 - II-1. Miozyny konwencjonalne
 - II-1A. Miozyny II
 - II-2. Miozyny niekonwencjonalne
 - II-2A. Miozyny I
 - II-2B. Miozyny III
 - II-2C. Miozyny IV
 - II-2D. Miozyny V
 - II-2E. Miozyny VI
 - II-2F. Miozyny VII
 - II-2G. Miozyny VIII
- III. Nadrodzina kinezyzny
 - III-1. Kinezyzna konwencjonalna
 - III-2. Białka podobne do kinezyzny
- IV. Nadrodzina dyneiny
- V. Porównanie strukturalnych i funkcjonalnych właściwości białek motorycznych

Contents:

- I. Introduction
- II. Superfamily of myosin
 - II-1. Conventional myosins
 - II-1A. Myosins II
 - II-2. Unconventional myosins
 - II-2A. Myosins I
 - II-2B. Myosins III
 - II-2C. Myosins IV
 - II-2D. Myosins V
 - II-2E. Myosins VI
 - II-2F. Myosins VII
 - II-2G. Myosins VIII
- III. Superfamily of kinesin
 - III-1. Conventional kinesin
 - III-2. Kinesin-like proteins
- IV. Superfamily of dynein
- V. Comparison of structural and functional properties of cytoplasmic motor proteins

Wykaz stosowanych skrótów: AMP PNP — 5'-adenyloimidodifosforan; EHNA — erytro-9[3-(2-hydroksynonylo)]adenina; PCR — reakcja łańcuchowa polimerazy.

I. Wstęp

Miozyna, dyneina i kinezyzna są białkami motorycznymi, których wspólną właściwością jest zdolność do przetwarzania energii chemicznej pochodzącej z hydrolizy trifosforanów nukleozydów w energię mechaniczną. Proces przemiany energii wymaga cyklicznego oddziaływania cząsteczek białka motorycznego z cytoszkieletowymi, liniowymi polimerami: filamentami aktynowymi (mikrofilamentami) w przypadku miozyny

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

i mikrotubulami w przypadku dyneiny i kinezy [1-3]. Podstawową podjednostką pierwszych są aktyny, białka o masie 42 kDa, a drugich tubuliny o masach 56 kDa (izofорма α) i 53 kDa (izofорма β). Po związaniu z polimerem białko motoryczne ulega zmianom konformacyjnym, które są niezbędne dla jego przesunięcia wzdłuż polimeru, a następnie od niego oddysocjuje. Ponowne wiązanie z kolejnym miejscem polimeru inicjuje nowy cykl reakcji. Zmiany powinowactwa białka motorycznego do polimeru i czas trwania jego jednostkowego przesuwu koordynują przejścia pomiędzy pośrednimi etapami cyklu hydrolizy nukleotydu.

Ruch białka motorycznego wzdłuż cząsteczki polimeru jest jednokierunkowy i wyznacza go strukturalna asymetria polimeru; jego koniec szybko rosnący (+) jest zarówno pod względem biochemicznym, jak i strukturalnym różny od końca wolno rosnącego (-). Miozyna przesuwa się w kierunku końca szybko rosnącego (+) filamentu aktynowego [4]. Białka motoryczne mikrotubul mogą przemieszczać się albo w kierunku ich końca szybko rosnącego (+), (kinezy-na) [5], albo w kierunku końca wolno rosnącego (-) (dyneina) [6]. Ostatnio jednak zidentyfikowano białka zarówno nadrodziny kinezy jak i dyneiny, które nie stosują się do tych reguł.

Wzajemna organizacja białek motorycznych i polimerów warunkuje różne formy ruchu (Ryc. 1). W przypadku transportu wewnątrzkomórkowego, białka motoryczne wiążą „ładunek” (organelle, chromosomy) i przenoszą go wzdłuż nieruchomych polimerów. Dla wywołania skurczu mięśnia, czy wydłużenia wrzeciona mitotycznego podczas anafazy B, a także generacji ruchu wici i rzęsek białka motoryczne tworzą mostki poprzeczne pomiędzy przeciwnie zorientowanymi polimerami cytoszkieletowymi i powodują ich przesuwanie względem siebie [7-9].

W świetle ogromnej liczby zjawisk ruchowych zachodzących w komórce, powstaje problem w jaki sposób właściwe białko motoryczne rozpoznaje odpowiednią organelę w odpowiednim czasie. Komórka

wydaje się rozwiązywać ten problem przez wytwarzanie licznych białek motorycznych o konserwatywnej domenie generującej ruch, połączonej z różnymi domenami, odpowiedzialnymi za specyficzne przyłączanie określonego „ładunku”. Niniejszy artykuł poświęcony jest nadrodzinom białek motorycznych, ich występowaniu, strukturze i funkcji. Do opisu struktury i funkcji wielu członków tych nadrodzin przyczyniły się, oprócz klasycznych metod biochemicznych i biologii komórki, metody analizy genetycznej i sekwencjonowania sklonowanych genów.

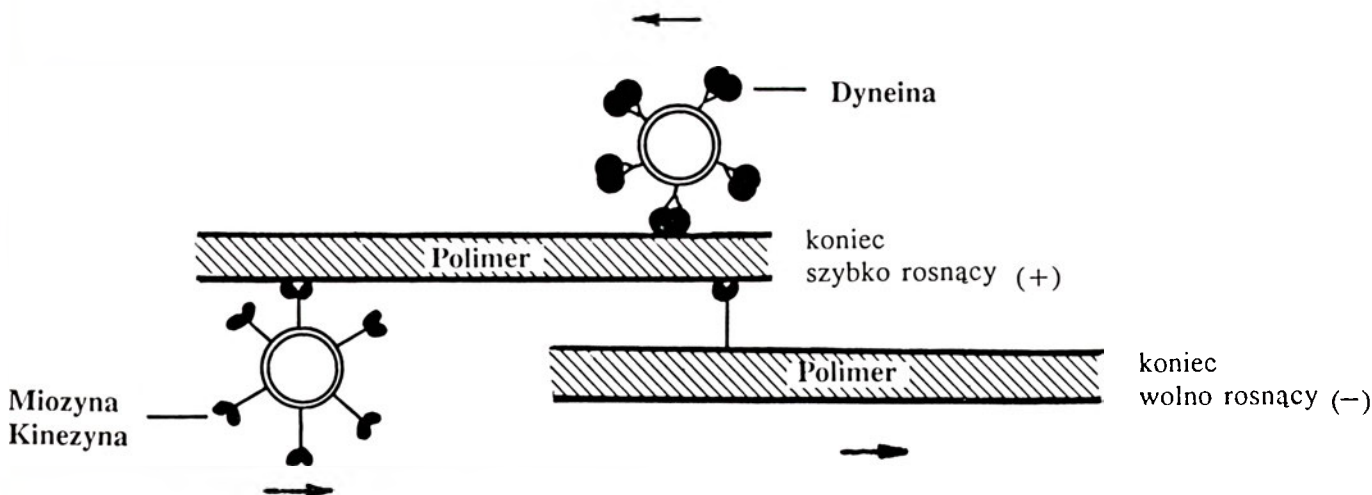
II. Nadrodzina miozyny

Miozyna, podobnie jak aktyna, występuje powszechnie w komórkach *Eukaryota*; jest obecna we wszystkich komórkach mięśniowych i niemięśniowych kręgowców i bezkręgowców (w tym także w komórkach pierwotniaków) oraz wyższych roślin. Strukturalne zróżnicowanie izoform miozyny jest znacznie większe niż izoform aktyny. Nadrodzinę miozyny stanowią tzw. konwencjonalne miozyny dwugłówkowe (miozyny II), które wykazują zdolności do tworzenia filamentów, i nie wykazujące tych właściwości niekonwencjonalne miozyny jednogłówkowe lub dwugłówkowe [10] (Ryc. 2). Wspólną cechą wszystkich białek nadrodziny miozyny, niezależnie od ich występowania w organizmach odległych ewolucyjnie, jest obecność w ich strukturze konserwatywnej domeny motorycznej o masie 80 kDa. Domena ta odpowiedzialna jest za wiązanie filamentów aktynowych, wiązanie i hydrolizę ATP oraz zdolność całej cząsteczki białka do przemieszczania się wzdłuż filamentów aktynowych.

II-1. Miozyny konwencjonalne

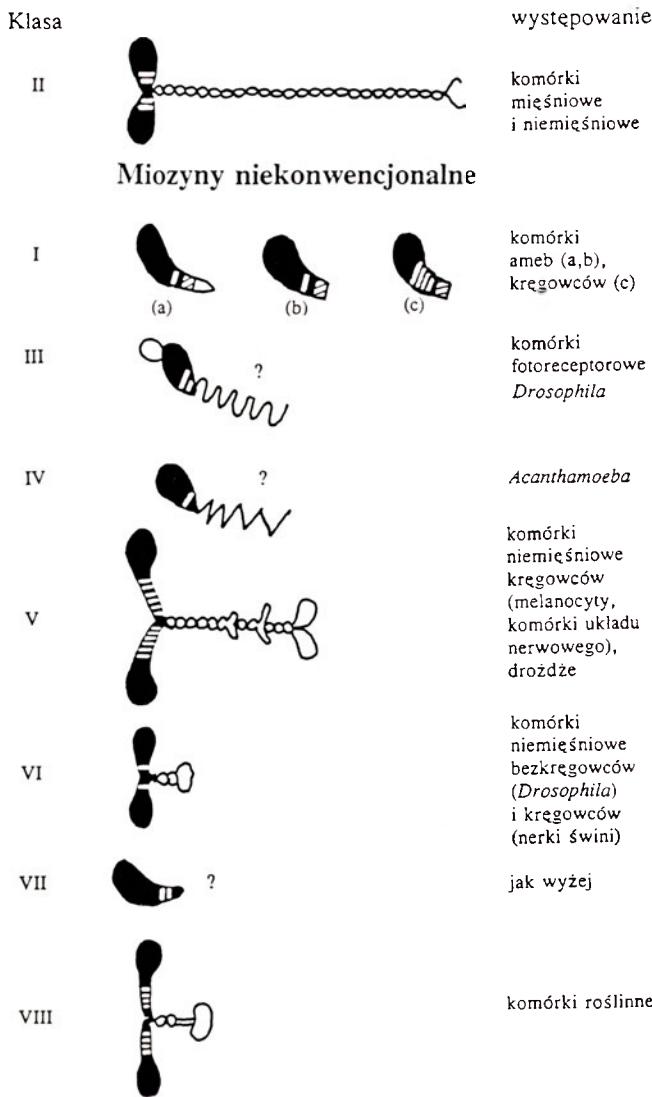
II-1A. Miozyny II

Wszystkie miozyny występujące w komórkach mięśniowych, a także homologiczne miozyny II komórek niemięśniowych stanowią grupę miozyn konwencjo-



Ryc. 1. Transport organelli wzdłuż polimerów cytoszkieletowych oraz przesuwanie polimerów względem siebie przez białka motoryczne (modyfikacja ryciny wg Vale i inn. [9]).

Miozyny konwencjonalne



Ryc. 2. Nadrodzina miozyny. Struktura cząsteczek konwencjonalnej i niekonwencjonalnej miozyny (wg Cheney'a i inn. [10]). Główki zaznaczone czarnym kolorem, łańcuchy lekkie (w rejonie „szyjki”) białymi odcinkami (liczba białych odcinków odpowiada liczbie łańcuchów lekkich). Miejsca wiązania z błoną miozyny I są zakreślane.

nalnych. Są one heksamerami zbudowanymi z dwóch łańcuchów polipeptydowych zwanych ciężkimi o masie około 200 kDa, które są połączone z parą regulatorowych (20 kDa) i parą istotnych (16-25 kDa) łańcuchów lekkich [11]. Łańcuchy lekkie są niekowalencyjnie związane z globularnymi regionami końca N łańcuchów ciężkich miozyny tworzącymi główki. Na pozostałym odcinku łańcuchy ciężkie mają strukturę α -helikalną i są połączone wiązaniami hydrofobowymi w superhelisę. Taka struktura C-końca odcinka łańcuchów ciężkich jest niezbędna dla wytworzenia — dzięki oddziaływaniom elektrostatycznym między cząsteczkami miozynowymi — dwubiegunowych przeciwrównoległych filamentów, na których powierzchni (z wyjątkiem strefy centralnej) regularnie rozmieszczone są główki. Główki miozynowe zawierają

domeny motoryczne białka [12, 13]. Analizy sekwencji reszt aminokwasowych lub reszt nukleotydowych cDNA miozyny II z różnych źródeł, wykazały niski stopień homologii ogólnej łańcuchów lekkich i ciężkich. Jednakże sekwencja reszt aminokwasowych fragmentu ciężkiego łańcucha tworzącego główkę różnych izoform miozyny, a szczególnie jej regionów wiążących ATP i aktynę, jest znacznie bardziej konserwatywna niż sekwencja pozostałej części cząsteczki. U izoform miozyny z mięśni poprzecznie prążkowanych homologia tej domeny wynosi 80%, natomiast u izoform miozyny z mięśni prążkowanych i gładkich tego samego gatunku około 50% [10]. Sekwencja C-końcowego fragmentu łańcuchów ciężkich miozyny niemięśniowych klasy II znacznie odbiega od sekwencji izoform mięśniowych, zachowując jednak periodyczne rozmieszczenie reszt hydrofobowych i polarnych, konieczne dla wytworzenia struktury helikalnej i agregacji w filamenty [11]. Innym warunkiem koniecznym dla tworzenia filamentów przez miozynę niemięśniową klasy II (podobnie jak przez miozynę z mięśni gładkich) jest fosforylacja jej regulatorowych łańcuchów lekkich, która powoduje zmianę struktury cząsteczki ze zwiniętej (o stałej sedymentacji 11S) w wyprostowaną (6S) [14]. W warunkach zbliżonych do fizjologicznych ufosforylowana, cytoplazmatyczna miozyna II tworzy jednakże znacznie mniejsze filamenty. Podczas gdy filamenty miozyny mięśni szkieletowych zbudowane są z 300-400 monomerów i mają długość 1.5 μm , filamenty miozyny II z płytek krwi tworzy około 30 cząsteczek i ich długość wynosi 0.3 μm ; wymiary filamentów miozyny II z *Acanthamoeba castellanii* są jeszcze mniejsze [15]. Wydaje się, że w komórkach niemięśniowych miozyna występuje w postaci monomerycznej lub oligomerycznej (oktamery), a filamenty tworzone są w miarę potrzeby, dla wykonania określonej czynności ruchowej [16]. Aktywność enzymatyczna miozyny II komórek niemięśniowych i jej efektywność w generowaniu ruchu *in vitro* są znacznie niższe od tych, które charakteryzują miozyny II z mięśni szkieletowych [17, 18]. Wydaje się to być w zgodzie z nieporównanie większym wydatkowaniem energii potrzebnej dla wywołania skurczu mięśni, niż dla generacji procesów związanym z ruchliwością komórkową.

Przy użyciu technik immunocytochemicznych znaleziono filamenty miozyny II razem z filamentami aktynowymi w pierścieniu kurczliwym dzielących się komórek [16, 19-20], u podstawy mikrokosmków enterocytów [21, 22], pod błoną komórkową podczas czapczkowania (capping) receptorów w limfocytach T [23], we włóknach naprężeniowych komórek stacjonarnych [24, 25] i w tylnym biegunie migrujących komórek [16, 26, 27]. Powyższe obserwacje wskazują na udział miozyny II w cytokinezie, w falowaniu mikrokosmków enterocytów, gromadzeniu receptorów i lokomocji komórek na zasadzie ślizgowego mechanizmu filamentów miozynowych i aktynowych charakterystycznego dla skurczu mięśni.

II-2. Miozyny niekonwencjonalne

II-2A. Miozyny I

W cytosolu komórek mięśniowych oprócz miozyny dwugłówkowej występują izoformy miozyny jednogłówkowej, określane jako miozyny I [28]. Najwcześniejsze miozyny I zostały wyizolowane z komórek ameb *Acanthamoeba castellani* (IA, IB, IC) i *Dictyostelium discoideum* (IB) (prace cytowane w [28]), później homologiczne białka znaleziono również w komórkach kręgowców: np. w mikrokosmkach enterocytów [29], rdzeniu nadnerczy [30], mózgu [30], nerce [31] i komórkach mięśni gładkich [32]. Miozyny I są zbudowane z pojedynczego łańcucha ciężkiego (105-140 kDa), niehelikalnej, stosunkowo krótkiej części pałeczkowatej niezdolnej do wytwarzania filamentów, i różnej liczby (1-4) specyficznych łańcuchów lekkich (Ryc. 2). Wszystkie wykazują aktywność ATP-azy aktywowanej przez aktynę (choć w znacznie mniejszym stopniu niż w przypadku miozyny II), zdolność wiązania aktyny i generowania ruchu wzdłuż filamentów aktynowych *in vitro* [28]. Właściwości te związane są z N-końcowym regionem łańcucha ciężkiego tworzącym główkę, który, jak wykazały badania sekwencji cDNA, jest w około 55% homologiczny z odpowiednim regionem łańcucha ciężkiego tworzącego główkę miozyny II. Sekwencja regionu C-końca łańcucha ciężkiego miozyn klasy I nie wykazuje żadnego podobieństwa do regionu C-końca łańcucha ciężkiego miozyn klasy II. Mimo znacznych różnic w sekwencji tego fragmentu, również wśród poszczególnych izoform miozyny I, łączy je zdolność bezpośredniego wiązania z błonami zawierającymi fosfolipidy anionowe (fosfatydyloserynę, fosfatydyloinozytol, difosforan fosfatydyloinozytolu) [29, 33, 34]. Za wiązanie to odpowiedzialna jest silnie zasadowa domena miozyn I znajdująca się w regionie końca C ciężkiego łańcucha.

W porównaniu z miozynami I komórek kręgowców oraz miozynami IA i IE *Dictyostelium*, których C-końcowy region ciężkiego łańcucha zakończony jest domeną zakotwiczącą go w błonie komórkowej, koniec C pozostałych izoform miozyny I ameb jest wydłużony o dodatkowy odcinek, którego sekwencja aminokwasowa wzbogacona jest w glicynę, prolinę i alaninę lub glutaminę (domena GPA lub GPQ) [28] i obejmuje drugie, niezależne od ATP, miejsce wiązania aktyny [35]. Domena ta sąsiaduje z 50 aminokwasową domeną SH3_{src}, charakterystyczną dla białek związanych z aktynowym cytoszkieletem błonowym [33]. Drugie miejsce wiązania aktyny sprawia, że miozyna I może mieć taką samą rolę funkcjonalną jaką ma tworząca filamenty miozyna II; obie, sieciując filamenty aktynowe, mogą przesuwać je względem siebie dzięki stałemu połączeniu z jednym filamentem i sprzężonemu z hydrolizą ATP cyklicznemu oddziaływniu z drugim (patrz Ryc. 1.).

Badania biochemiczne i immunofluorescencyjne wykazały, że miozyny I związane są z błoną *in situ* [33, 34, 36]. U ameb występują one szczególnie w krawędziach wiodących migrujących komórek [20, 37-38], w fagocytarnym kubku [37] i na powierzchni takich pęcherzyków komórkowych, jak kurczliwe wodniczki tętniące, które kontrolują ciśnienie osmotyczne w komórce [39]. Wyniki badań izoform miozyny I ameb wydają się sugerować ich funkcjonalną specjalizację. Podczas gdy miozyna IA i IB *Dictyostelium* prawdopodobnie wpływa na subtelne zmiany w zachowaniu komórki towarzyszące lokomocji, fagocytozie i transportowi pęcherzyków typu endosomów [40, 41], miozyna IC *Acanthamoeba* jako jedyna wiąże się z wodniczkami tętniącymi i współdziałając z filamentami aktynowymi powoduje skurcz cytoszkieletu wokół nich, usuwając w ten sposób zawartą w nich wodę do przestrzeni pozakomórkowej [42].

Izoformy miozyny I różnią się ilością i strukturą łańcuchów lekkich. Miozyny ameb zawierają jeden lub dwa specyficzne łańcuchy lekkie [28], natomiast miozyny I kręgowców mają trzy do czterech łańcuchów lekkich, którymi są cząsteczki kalmoduliny [43]. Miejscem zakotwiczenia cząsteczek kalmoduliny jest powiększony region „szyjki” (łączy główkę z częścią pałeczkowatą) miozyny I, zawierający przynajmniej trzy razy powtórzony motyw aminokwasowy IQ (IQXXRGXXR) [44]. Później wykazano, że region o podobnej strukturze, wiążący w nieobecności Ca²⁺ kalmodulinę (lub inne białko o strukturze „EF hand”) występuje we wszystkich miozynach, a także innych białkach wiążących kalmodulinę [45]. Obecność kalmoduliny w cząsteczce miozyny I mięśniowych komórek kręgowców sugeruje, że regulacja jej aktywności zależy od Ca²⁺. Osłabienie wiązania łańcuchów kalmodulinowych z łańcuchami ciężkimi miozyny I z mikrokosmków enterocytów pod wpływem Ca²⁺ i towarzyszące mu zahamowanie przesuwania miozyny wzdłuż immobilizowanych filamentów aktynowych *in vitro* [29] przemawiają za słusznością tego poglądu.

Rola miozyny I w komórkach kręgowców nie jest jeszcze w pełni poznana; przypisuje się jej udział w łączeniu aktyny z błoną komórkową, a także w generowaniu ruchu mikrokosmków i transportowaniu pęcherzyków błonowych [10, 29].

II-2B. Miozyny III

Jednogłówkowa miozyna III, białko najbardziej różniące się od innych miozyn, kodowane jest przez gen *ninaC* i ulega ekspresji w komórkach fotoreceptorowych oczu *Drosophila* [46]. Występuje ono w postaci dwóch izoform o masach 174 kDa i 132 kDa różniących się długością części pałeczkowatej. C-końcowe domeny obydwu izoform różnią się między sobą, nie są też podobne do domen C-końcowych innych dotąd poznanych miozyn, z wyjątkiem regionu zawierającego jeden lub dwa motywy sekwencji IQ. Ogólna

homologia miozyn III i miozyn I oraz miozyn II wynosi tylko dwadzieścia kilka procent. Unikalną cechą obydwu miozyn klasy III jest dodatkowa 30 kDa domena o aktywności kinazy białkowej, połączona z N końcowym fragmentem główki (Ryc. 2).

Mikroskopia immunofluorescencyjna wykazała, że izoforma miozyny III o wyższej masie jest obecna w organellach zwanych rabdomerami, strukturach zbliżonych do mikrokosmków, które zawierają elementy cytoszkieletu, rodopsynę i inne białka związane z procesem fototransmisji. Izofoma o niższej masie znajduje się w cytosolu komórek fotoreceptorowych [47]. Przypuszcza się, że miozyny te biorą udział w falowaniu błon rabdomeru lub/i w fototransmisji. Mutacja ich genów powoduje degenerację komórek fotoreceptorowych poprzez redukcję wielkości rabdomerów oraz zmniejszoną zawartość rodopsyny w ich wnętrzu [46].

II-2C. Miozyny IV

Przedstawicielem miozyn klasy IV jest niekonwencjonalna miozyna jednogłówkowa z *Acanthamoeba* o masie 177 kDa [48]. Region jej główki oraz główki innych miozyn są homologiczne, podczas gdy domena pałeczkowata o masie 87 kDa jest zupełnie inna za wyjątkiem 50 aminokwasowej sekwencji SH₃_{src} na końcu C cząsteczki. Białko to nie zawiera znalezionej u miozyny I ameb sekwencji odpowiadającej miejscu wiązania z błoną.

II-2D. Miozyny V

Miozyny klasy V są niekonwencjonalnymi miozynami dwugłówkowym. Ich łańcuchami ciężkimi są m.in.: produkt mysiego genu *dilute* o masie 215 kDa (którego mutacja powoduje rozjaśnienie sierści zwierząt z powodu dysfunkcji melanocytów, a często także ciężkie zaburzenia neurologiczne) [49], produkt genu *MYO2* drożdży *Saccharomyces cerevisiae* o masie 180 kDa [50] oraz homologiczne białko o masie 190 kDa z mózgu kurczaków [51]. Oprócz podobnych do innych miozyn regionów główek, wszystkie te białka charakteryzują się bardzo rozbudowanym, 18 kDa regionem „szyjki”, w której występuje sześć tandemowych powtórzeń sekwencji motywu IQ, i która jest miejscem wiązania 12 cząsteczek kalmoduliny [52]. „Szyjka” połączona jest z około 30 nm odcinkiem pałeczkowatym zakończonym unikalną domeną globularną o masie 47 kDa. Obecność w regionie pałeczkowatym łańcuchów ciężkich α -helikalnych odcinków (obejmujących od 150-500 reszt aminokwasowych) powoduje, że miozyny V tworzą dimery, ale nie tworzą filamentów. Wykazano, że przemieszczanie miozyny V wzdłuż immobilizowanych filamentów aktynowych *in vitro*, podobnie jak w przypadku miozyny I z mikrokosmków enterocytów, jest regulowane przez zmianę stężenia Ca²⁺ i kalmodulinę [53]. Jakkolwiek funkcja tej

grupy miozyn nie jest jeszcze poznana, przypuszcza się, że są one składnikami organelli błonowych na obwodzie komórki lub kortykalnego cytoszkieletu. Badania immunofluorescencyjne wykazały, że miozyny klasy V są rzeczywiście związane z jedną lub kilkoma błonowymi organellami znajdującymi się w regionie perinuklearnym [54], co sugeruje, że mogą one brać udział w transporcie tych organelli.

II-2E. Miozyny VI

Niekonwencjonalną miozynę dwugłówkową klasy VI zidentyfikowano w chromosomalnym *locus* 95F *Drosophila* [55]. Na podstawie analizy sekwencji sklonowanego cDNA genu kodującego region główki wykazano, że jej homolog występuje również w linii komórkowej nerek świni [56]. Sąsiadująca z główkami domena tych miozyn zawiera krótki odcinek którego reszty aminokwasowe zdolne są do tworzenia superhelisy, pozostała część fragmentu końca C jest charakterystyczna tylko dla miozyn klasy VI. Miozyna VI z *Drosophila* występuje w cytoplazmie zarodków much [55]. Jej rola fizjologiczna nie jest jeszcze poznana.

II-2F. Miozyny VII

VII klasę niekonwencjonalnych miozyn jednogłówkowych stanowi miozyna *Drosophila* kodowana przez chromosomalne *locus* 35B,C [57]. Podobne białko zidentyfikowano w linii komórkowej nerek świni [56]. Do tej pory zsekwencjonowano tylko domeny główki tych miozyn. Nie jest znana struktura pozostałej części ich cząsteczek, a także funkcja.

II-2G. Miozyny VIII

Do klasy VIII zaliczana jest nowoodkryta, na podstawie sklonowanego kodującego ją cDNA, miozyna z wyższych roślin (*Arabidopsis thaliana*) [58]. Jest to białko o masie 131 kDa, charakterystycznej dla wszystkich miozyn domenie motorycznej główki i unikalnej strukturze fragmentów końca N i C. Nieco oddalony od końca C fragment posiada cztery potencjalne miejsca wiązania kalmoduliny (motywy IQ), a w ich sąsiedztwie mały region tworzący superhelisę. Wysunięto przypuszczenie, że miozyna VIII bierze udział w przenoszeniu w komórkach roślinnych organelli, takich jak chloroplasty czy siateczka endoplazmatyczna.

III. Nadrodzina kinezy

Nadrodzina kinezy, podobnie jak nadrodzina miozyny, obejmuje liczną grupę białek [59, 60] (Ryc. 3). Większość z nich zidentyfikowano przez porównanie sekwencji genów izolowanych różnymi metodami, włączając klonowanie genetycznie zidentyfikowanych *loci* i PCR [61]. Wszystkie te białka charakteryzują się

Kinezyzna konwencjonalna

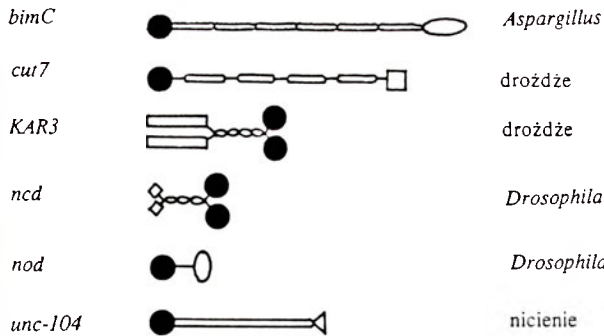
występowanie



komórki kregowców, bezkregowców

Białka podobne do kinezyzny

gen



Ryc. 3. Nadrodzina kinezyzny. Struktura cząsteczki kinezyzny konwencjonalnej i przewidywanych białek podobnych do kinezyzny (wg Goldsteina [59]). Główki zaznaczone czarnym kolorem. W przypadku białek podobnych do kinezyzny podano strukturę łańcuchów ciężkich. Lekkie łańcuchy konwencjonalnej kinezyzny zaznaczono dwoma odcinkami w regionie końca cząsteczki.

homologiczną domeną motoryczną, obejmującą 340 reszt aminokwasowych, która odpowiedzialna jest za wiązanie z mikrotubulami, wiązanie i hydrolizę ATP oraz generację ruchu wzdłuż mikrotubul.

III-1. Kinezyzna konwencjonalna

Kinezynę po raz pierwszy odkryto w aksonie olbrzymim mątwy [62], a następnie także w różnych tkankach i komórkach zwierzęcych (mózg ssaków [63], wątroba szczura [64], rdzeń nadnerczy wołu [65], jaja jeżowca [66], fibroblasty zarodków kurzych [67], komórki *Drosophila* [68], *Acanthamoeba* [69] i *Dictyostelium* [70]). Natywny enzym, o masie około 360 kDa, jest tetramerem złożonym z dwóch identycznych łańcuchów ciężkich o masach 110-134 kDa i dwóch łańcuchów lekkich o masach 60-80 kDa [59]. Cząsteczka kinezyzny ma długość około 80 nm i składa się z trzech strukturalnych domen (Rys. 3). Na końcu N każdego z łańcuchów ciężkich znajduje się region globularny o masie 50 kDa i wymiarach 9×10 nm, zwany główką, w której mieści się domena motoryczna. Jak wykazały badania natywnych, pozbawionych końcowych reszt aminokwasowych i chimerycznych łańcuchów ciężkich, wytwarzanych przez *E. coli*, spośród 450 reszt aminokwasowych tworzących główkę, domenę motoryczną tworzy 340 reszt. Główki połączone są z długą (50-60 nm) częścią pałeczkową, w której α -helikalne odcinki ciężkich łańcuchów tworzą superhelisę. W środkowej części pałeczki superhelisa jest zaburzona, co powoduje obserwowane często w mikroskopie elektronowym zagięcie cząsteczki. W regionie końca C łańcuchy ciężkie nie tworzą

struktury α -helikalnej i razem z łączącymi się z nimi łańcuchami lekkimi tworzą wachlarzowate zakończenie cząsteczki. C-końcowa domena globularna łańcuchów ciężkich, o masie 10-15 kDa, z nagromadzonym ładunkiem dodatnim bierze prawdopodobnie udział nie tylko w wiązaniu łańcuchów lekkich, ale również przenoszonych przez kinezyne organelli. Jej dodatkową funkcją może być regulacja aktywności motorycznej enzymu. Ponieważ kinezyzna, podobnie jak miozyna II z mięśni gładkich i komórek niemięśniowych, występuje w dwóch formach konformacyjnych: enzymatycznie nieaktywnej, zwiniętej (o stałej sedymentacji 9 S) i aktywnej, wyprostowanej (6 S), można przypuszczać, że jej aktywacja zachodzi poprzez fosforylację łańcuchów lekkich lub ciężkich [71]. Informacje dotyczące oddziaływania kinezyzny z mikrotubulami i cząstkami przez nią transportowanymi są nadal fragmentaryczne. Ostatnio z mikrosomów mózgu zarodków kurzych wyizolowano integralne białko błonowe o masie 160 kDa, które w sposób zależny od ATP wiąże kinezyne i może pełnić funkcję jej receptora [72].

Wprowadzenie do komórki nerwowej przeciwciał skierowanych przeciw kinezyzie lub specyficznego inhibitora — niehydrolizowalnego analogu ATP, AMP-PNP — utrwalającego jej wiązanie z mikrotubulą pozwoliło wykazać, że białko to jest odpowiedzialne za szybki wstępujący (+) transport aksonalny (w kierunku obwodu neuronu) pęcherzyków synaptycznych [73, 74]. Immunolokalizacja kinezyzny na organellach gromadzących się w proksymalnej części podwiązanych nerwów obwodowych [75], odpowiada tej roli. Przy użyciu przeciwciał wykazano, że kinezyzna bierze również udział w organizacji tubularnych układów błonowych (endoplazmatycznego reticulum, aparatu Golgiego, endosomów i lizosomów) przez wydłużanie i umieszczanie elementów błonowych wzdłuż mikrotubul [76], a także w dyspersji organelli zawierających pigment [77].

III-2. Białka podobne do kinezyzny

Pierwszym zidentyfikowanym białkiem podobnym do kinezyzny był produkt genu *bimC* (*blocked in mitosis C*) grzyba *Aspergillus nidulans* [78]. Gen ten zidentyfikowano dzięki jego mutacji, której fenotypowym efektem było zaburzenie zdolności do podziału jądra. Analiza sekwencji sklonowanego cDNA wykazała, że koduje on białko, o masie 132 kDa, które składa się z głowy znajdującej się w końcu N cząsteczki i sąsiadującego z nią długiego, obejmującego 700 reszt aminokwasowych odcinka pałeczkowego o sekwencji niepodobnej do odcinka pałeczkowego konwencjonalnej kinezyzny (Ryc. 3). Domena motoryczna białka kodowanego przez *bimC* wykazuje większy stopień identyczności z domeną motoryczną białka o masie 121 kDa kodowanego przez gen *cut7* drożdży *Schizosaccharomyces pombe* [79] i białka o masie 120 kDa kodowanego przez gen *Eg5*, *Xenopus laevis* [80] niż

z domeną motoryczną kinezyiny konwencjonalnej. Wszystkie trzy białka wykazują ponadto pewien stopień homologii regionu C końca odpowiedzialnego za ich dimeryzację. Podobna struktura tych białek, a także zaburzenie wczesnych etapów mitozy przez mutacje ich genów sugeruje, że pełnią one podobną funkcję w komórce. Przypuszcza się, że polega ona na rozsuwaniu biegunów wrzeciona podczas mitozy w efekcie tworzenia mostków między zachodzącymi na siebie przeciwnoległymi mikrotubulami z obydwu połówek wrzeciona podziałowego i przesuwanie ich względem siebie w kierunku obwodu komórki [78, 79].

Inne białko podobne do kinezyiny zidentyfikowano jako produkt genu *KAR3*, *S. cerevisiae* [81]. Mutant *KAR3* wykazuje obniżoną zdolność do fuzji jądrowej podczas kariogamii. Analiza sekwencji cDNA wykazała, że kodowane przez *KAR3* białko o masie 84 kDa ma sekwencję 328 reszt aminokwasowych regionu końca C w 39% identyczną z sekwencją łańcucha ciężkiego kinezyiny *Drosophila*, oraz że region identyczności odpowiada domenie motorycznej. Ponadto stwierdzono, że zawierający 390 reszt aminokwasowych, i mający na pewnym odcinku zdolność do wytworzenia struktury α -helikalnej, fragment końca N białka *KAR3* nie jest podobny do C-końcowego fragmentu kinezyiny. Obserwacje te wskazują, że domena motoryczna każdego z łańcuchów ciężkich białka *KAR3* znajduje się w jego C-końcowym fragmencie. Dotąd nie wiadomo, czy odmienna lokalizacja domen motorycznych wpływa na kierunek ruchu tego białka wzdłuż mikrotubul, jak to ma miejsce w przypadku produktu genu *ndc* (patrz niżej). Przewidywana rola białka *KAR3* to udział w wydłużaniu wrzeciona mitotycznego na zasadzie opisanej dla białek *bimC* i *cut7* oraz w przenoszeniu jądra podczas kariogamii.

Badania genu *ndc* (*claret non disjunctional*) *Drosophila*, który wpływa na kolor oczu (dyspersję organelli zawierających pigment) i dystrybucję chromosomów podczas mejozy, doprowadziły do wykrycia następnego białka nadrodziny kinezyiny [82]. Analiza sekwencji cDNA wykazała, że domeny motoryczne tego białka o masie 70 kDa znajdują się również we fragmencie C-końcowym łańcucha ciężkiego. Koniec N zawierający 320 reszt aminokwasowych jest podobny do końca N białka *KAR3* i może tworzyć strukturę α -helikalną. Testy ruchliwości *in vitro* wykazały, że sklonowane w bakteriach białko *ndc* przemieszcza się w kierunku końca (-) mikrotubuli [83], co jest zgodne z jego sugerowaną rolą w przemieszczaniu chromosomów w kierunku biegunów podczas podziału komórkowego. Jest więc interesujące, czy białko nadrodziny kinezyin o masie 74 kDa kodowane przez inny gen, *nod* (*no distributive disjunction*) *Drosophila* [84], które asocjuje z chromosomami, przemieszcza się w kierunku końca (+) mikrotubuli.

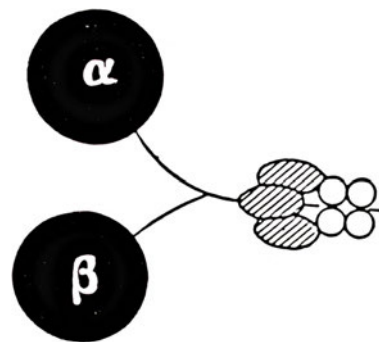
W odróżnieniu od białek biorących udział w mitozie, produkt genu *unc-104* nicienia *Caenorhabditis elegans* jest białkiem podobnym do kinezyiny, które

odgrywa rolę w wstępującym (+) szybkim transporcie aksonalnym pęcherzyków synaptycznych [85]. Białko to złożone jest z 1584 reszt aminokwasowych i posiada domenę motoryczną w regionie końca N.

Zastosowanie techniki PCR połączonej z sekwencjonowaniem doprowadziło do wykrycia kolejnych białek nadrodziny kinezyiny u *Drosophila* [82, 86, 87] i *S. cerevisiae* [88, 89]. Białka te biorą udział w podziałach komórkowych, a niektóre z nich, podobnie jak kinezyina, uczestniczą w transporcie aksonalnym.

IV. Nadrodzina dyneiny

Cytoplazmatyczne dyneiny są rozpuszczalnymi homologami aksonemalnych dynein wici i rzęsek [60, 90], a także ich prekursorami w aksonemach podczas wczesnej embriogenezy [91]. Zidentyfikowano je w wielu tkankach i komórkach zwierzęcych (mózg wołu [92], wątroba i jądra szczura [64, 93], nicien *C. elegans* [94], małwa [95], jaja jeżowca [96], *Paramecium* [97], ameba *Reticulomyxa* [98], *Dictyostelium* [99], komórki HeLa [100]). Badania przy użyciu skaningowego transmisyjnego mikroskopu elektronowego (STEM) wykazały, że cząsteczka cytoplazmatycznych dynein ma długość 50 nm i składa się z dwóch globularnych regionów o średnicy 13.4 nm, zwanych główkami, które połączone są cienkimi pałeczkowatymi odcinkami z mniejszym regionem globularnym [92]. Jej masa wynosi ≥ 1200 kDa. Dyneiny są kompleksem wielu różnych podjednostek; np. dyneina z mózgu, znana uprzednio pod nazwą MAP (*microtubule associated protein*) 1C, zbudowana jest z dwóch łańcuchów ciężkich (każdy o masie około 500 kDa), trzech łańcuchów pośrednich (70-74 kDa) i czterech łańcuchów lekkich (53-59 kDa) [90, 101] (Ryc. 4). Łańcuchy ciężkie tworzą główki (α i β) (dyneina aksonemalna może zawierać dodatkową główkę γ) i giętkie pałeczkowate odcinki, które u podstawy łączą się z łańcuchami pośrednimi i lekkimi. Główki są miejscem wiązania mikrotubul oraz miejscem wiązania i hydrolizy ATP. Rola łańcuchów pośrednich dyneiny wydaje się być związana z zakotwiczeniem przenoszonych obiektów, podczas gdy łańcuchy lekkie biorą udział w regulacji jej aktywności enzymatycznej.



Ryc. 4. Przedstawiciel nadrodziny dyneiny. Struktura dyneiny z mózgu (MAP 1C) (wg Vallee [90]). Główki zaznaczone kolorem czarnym, łańcuchy pośrednie są zakreskowane, a łańcuchy lekkie niezakreskowane.

Ostatnio, przy zastosowaniu dwu różnych strategii klonowania oznaczono sekwencję 4466 aminokwasów łańcucha ciężkiego β dynein pochodzących z aksonem wici plemników dwu gatunków jeźowców [102, 103]. Analiza sekwencji aminokwasów wskazuje, że jest to białko motoryczne zupełnie różne od kinezyn i miozyny, oraz że tylko region złożony z nie więcej niż 120 reszt aminokwasowych zdolny jest do tworzenia struktury α -helikalnej. W odróżnieniu od miozyny i kinezyny, które wiążą jedną cząsteczkę ATP, dyneina ma kilka przypuszczalnych miejsc wiązania tego nukleotydu. Ponieważ hydroliza tylko jednej cząsteczki ATP wystarcza dla funkcji motorycznych tego białka, sądzi się, że przyłączanie ATP do pozostałych miejsc reguluje allosterycznie działanie enzymu [87]. Hamowanie przemieszczania mikrotubul pod wpływem dyneiny przy dużych stężeniach ATP wskazuje, że koncepcja ta jest słuszna.

Badania immunocytochemiczne, a także zastosowanie specyficznych inhibitorów dyneiny (wanadanu, który w obecności ATP i promieni ultrafioletowych powoduje rozszczepienie domeny motorycznej, oraz analogu adenozyiny EHNA), pozwoliło na wykazanie udziału dyneiny we wstecznym (–) transporcie organeli z synapsy do centrum aksonu [104, 105], w przemieszczaniu chromosomów w kierunku biegunów wrzeciona mitotycznego [106, 107] oraz w endocytozie [108]. We wszystkich tych procesach kierunek transportu „ładunku” przez cytoplazmatyczną dyneinę kręgowców zgodny jest z kierunkiem określonym w badaniach *in vitro* (tj. kierunkiem ku końcowi (–) mikrotubul) oraz polarnością mikrotubul w aksonie i wrzecionie kariokinetycznym. Ewentualnym jest więc dwukierunkowy ruch dyneiny obserwowany w przypadku ameby *Reticulomyxa* [87].

Mało dotąd wiadomo o regulacji aktywności motorycznej dyneiny. Przypuszcza się, że rolę w tym procesie odgrywa bądź fosforylacja dyneiny, bądź białka wiążące się z dyneiną. Ostatnio zwraca się uwagę na kompleks dynaktyny, który składa się z izoformy α centraktyny (białka homologicznego do aktyny) oraz białek o masach 150 kDa i 50 kDa, i towarzyszy preparatom cytoplazmatycznej dyneiny [109]. Wykazano, że kompleks ten promuje indukowany przez dyneinę ruch pęcherzyków *in vitro*, podczas gdy dyneina bez tego kompleksu jest w tym oznaczeniu nieaktywna [110]. Kolokalizacja dynaktyny z końcem (–) mikrotubuli sugeruje interakcję dynaktyny z cytoplazmatyczną dyneiną *in vivo*. Poznano również białka nazwane „spinaczami” (*clips*), których zadaniem jest przywiązywanie organeli do mikrotubul [111].

Zarówno dyneina cytoplazmatyczna, jak i aksonemalna, występują w wielu formach polimorficznych, różniących się liczbą podjednostek, a także ich strukturą [8]. Przypuszcza się, że poznanie sekwencji łańcucha ciężkiego β dyneiny pozwoli na zidentyfikowanie, sklonowanie i zsekwencjonowanie genów nowych członków nadrodziny dyneiny, zawierających podob-

ną domenę motoryczną, ale połączoną z innymi domenami niż dotąd poznane.

V. Porównanie strukturalnych i funkcjonalnych właściwości białek motorycznych

Przedstawiony w poprzednich rozdziałach przegląd białek motorycznych trzech nadrodziny: miozyny, kinezyny i dyneiny zwraca uwagę na, niezależne od wielkości ich cząsteczek, podobieństwo strukturalne. Wszystkie posiadają jedną lub dwie domeny motoryczne znajdujące się w globularnym regionie cząsteczki (na ogół końcu N ciężkich łańcuchów). Domeny te połączone są z częścią pałeczkowatą, w przypadku wielu miozyn i kinezyn tworzącą strukturę α -helikalną, odpowiedzialną za dimeryzację łańcuchów ciężkich. Na końcu C białek motorycznych znajduje się region odpowiedzialny prawdopodobnie za przyłączanie przenoszonych przez nie organeli. Dodatkowy element stanowią łańcuchy lekkie lub inne białka wpływające na aktywność białek motorycznych. Mimo podobnej morfologii miozyn, kinezyn i dynein, analiza sekwencji aminokwasów ich ciężkich łańcuchów nie wykazała żadnych regionów homologicznych, z wyjątkiem sekwencji wiążącej ATP (która jest charakterystyczna dla wszystkich białek wiążących ATP) i ewentualnych sekwencji aminokwasów tworzących strukturę α -helikalną [112].

Cykl hydrolizy ATP przez wszystkie trzy białka motoryczne jest podobny i składa się z trzech zasadniczych etapów: wiązania ATP z miejscem aktywnym białka, hydrolizy ATP i stymulowanego przez mikrofilamenty (w przypadku miozyny) i mikrotubule (w przypadku kinezyny i dyneiny) uwolnienia produktów hydrolizy ATP (ADP i P_n) [113, 114]. Ostatni etap związany z generacją siły jest etapem wolnym, ograniczającym szybkość procesu. Jednakże w przeciwieństwie do miozyny, gdzie uwolnienie P_n decyduje o szybkości hydrolizy, w przypadku kinezyny i dyneiny najwolniejszym etapem jest uwolnienie ADP. Występują też różnice w specyficzności substratowej tych trzech enzymów; podczas gdy konwencjonalne miozyny i kinezyna mogą hydrolizować również inne naturalnie występujące nukleotydy, dyneina aksonemalna wykazuje preferencję wobec ATP [115], natomiast dyneina cytoplazmatyczna może hydrolizować również GTP, TTP i CTP, ale tylko hydroliza ATP generuje ruch białka [101]. Dla aktywności wszystkich białek motorycznych niezbędne są dwuwartościowe jony magnezu lub wapnia.

Obecność izoform białek motorycznych: miozyny i dyneiny w wyspecjalizowanych komórkach lub strukturach komórkowych, takich jak komórki mięśniowe i wici, w których organizacja białek jest wysoce uporządkowana, pozwoliła zrozumieć strukturalne podstawy ruchu. Cytoplazmatyczne białka motoryczne występują w stosunkowo niskim stężeniu i ich organizacja w komórce jest trudna do śledzenia przy

pomocy mikroskopu elektronowego. Rozwinięto jednak techniki mikroskopowe połączone z możliwością obserwacji na ekranie obiektów tak małych jak 25 nm mikrotubule czy 40 nm pęcherzyki błonowe w stanie natywnym [116]. Powszechnie wykorzystano także tzw. testy ruchliwości *in vitro* (*motility assays*), polegające na ślizganiu w obecności ATP cytoplazmatycznych polimerów po powierzchni szklanej z zaadsorbowanym białkiem motorycznym, lub odwrotnie, przemieszczaniu kuleczek opłaszczonych białkami motorycznymi wzdłuż immobilizowanych filamentów aktynowych lub mikrotubul [117, 118]. Pozwoliły one na określenie szybkości i kierunku ruchu, a także minimalnej sekwencji ciężkich łańcuchów odpowiadającej domenie motorycznej. W ten sposób wykazano, że średnia szybkość ruchu generowanego przez miozyn konwencjonalną z mięśni szkieletowych wynosi 5,2 $\mu\text{m}/\text{sek}$, podczas gdy średnie szybkości ruchu generowanego przez dyneinę i kinezyne są niższe i wynoszą odpowiednio 1,3 i 0,3-0,4 $\mu\text{m}/\text{sek}$ [115, 118]. Kierunek ruchu, jakkolwiek w przypadku miozyn zdeteminowany przez polarność filamentów aktynowych, a w przypadku kinezyn i dynein przez polarność mikrotubul, wydaje się również zależeć od budowy domeny motorycznej białek generujących ruch [119]. Mimo, że podobieństwo sekwencji aminokwasowej domen motorycznych białek danej nadrodziny jest znaczne, to jednak subtelne zmiany strukturalne wywołane na przykład zmianą określonych sekwencji tych domen podczas ewolucji lub ich modyfikacją postranslacyjną mogą wpływać na kierunek ruchu. Wstępne badania wskazują, że zmiana pozycji domeny motorycznej kinezy, np. przez przeniesienie jej z końca N na koniec C cząsteczki nie wystarcza do zmiany kierunku generowanego przez nią ruchu [59].

Dotychczasowe badania białek motorycznych wskazują, że określone białko może ulegać ekspresji w wielu komórkach, niektóre komórki wytwarzają wiele białek motorycznych, a niektóre białka motoryczne mogą mieć funkcje, które są ważne tylko dla określonych tkanek. Jest więc możliwe, że każde białko motoryczne ma funkcje istotne i nieistotne, co stwarza możliwość funkcjonalnej wymienności różnych białek motorycznych. Rozważane są dwie możliwości zastępowania jednego białka motorycznego innym. Pierwsza, kiedy dany transport „ładunku” nie jest istotny i może być kompensowany przez inne procesy; druga, kiedy dwa białka motoryczne mogą przenosić ten sam „ładunek” dzięki na przykład podobnej sekwencji miejsca zakotwiczonego go. Na tej drugiej zasadzie wydaje się opierać kompensacja defektu genetycznego białka z nadrodziny miozyny (kodowanego przez gen *MYO2* z *S. cerevisiae*), przejawiającego się zaburzeniami sekrecji, przez zwiększoną ekspresję białka z nadrodziny kinezy (kodowanego przez gen *SMY1*) [120].

Artykuł otrzymano 22 lutego 1994 r.
Zaakceptowano do druku 3 marca 1994 r.

Podziękowanie

Mgr Robertowi Makuchowi dziękuję za cenne uwagi podczas przygotowania niniejszego artykułu.

Piśmiennictwo

- Huxley AF, Simmons RM (1971) *Nature* (Lond) **233**: 533-538
- Cohn SA (1990) *Mol Chem Neuropathol* **12**: 83-94
- Shpetner HS, Paschal BM, Vallee RB (1988) *J Cell Biol* **107**: 1001-1009
- Sheetz MP, Spudich JA (1983) *Nature* (Lond) **303**: 31-35
- Vale RD, Schnapp BJ, Matchison T, Steuer E, Reese TS, Sheetz MP (1985) *Cell* **43**: 623-632
- Paschal BM, Vallee RB (1987) *Nature* (Lond) **330**: 181-183
- Sheetz MP, Spudich JA (1983) *Cell Motil* **3**: 485-489
- Gibbons IR (1986) *J Biol Chem* **263**: 15837-15840
- Vale RD, Goldstein LSB (1990) *Cell* **60**: 883-885
- Cheney KE, Riley MA, Mooseker MS (1993) *Cell Motil Cytoskel* **24**: 215-223
- Warrick HM, Spudich JA (1987) *Annu Rev Cell Biol* **3**: 379-421
- Cooke R (1989) *Cell Motil Cytoskel* **14**: 183-186
- Rayment I, Rypniewski WR, Schmidt-Bäse K, Smith R, Tomchick DR, Benning MM, Winkelmann DA, Weisenberg G, Holden HM (1993) *Nature* (Lond) **261**: 50-57
- Tan JL, Ravid S, Spudich JA (1992) *Annu Rev Biochem* **61**: 721-759
- Pollard TD (1982) *J Cell Biol* **95**: 816-825
- Yonemura S, Pollard TD (1992) *J Cell Sci* **102**: 629-642
- Sellers JR, Soboeiro MS, Faust K, Bengur AR, Harvey EY (1988) *Biochemistry* **6**: 6977-6982
- Uemoto S, Sellers JR (1990) *J Biol Chem* **265**: 14864-14869
- Schroeder TS (1987) *Develop Biol* **124**: 9-23
- Zurek B, Sanger JM, Sanger JW, Jockusch BM (1990) *J Cell Sci* **97**: 297-306
- Mooseker MS, Pollard TD, Fujiwara K (1978) *J Cell Biol* **79**: 444-453
- Herman IM, Pollard TD (1981) *J Cell Biol* **88**: 346-351
- Pasternak C, Spudich JA, Elson EL (1989) *Nature* (Lond) **341**: 549-551
- Langanger G, Moeremans M, Daneels G, Sobieszek A, De Banbender M, DeMey J (1986) *J Cell Biol* **102**: 200-209
- Höner B, Jockusch B (1988) *Eur J Cell Biol* **47**: 14-21
- Fukui Y, Yumura S (1986) *Cell Motil Cytoskel* **6**: 662-673
- Nachmias VT, Fukui Y, Spudich JA (1989) *Cell Motil Cytoskel* **13**: 158-169
- Pollard TD, Doberstein SK, Zot HG (1991) *Annu Rev Physiol* **53**: 653-681
- Mooseker MS, Wolenski JS, Coleman TR, Cheney RE, Espreafico EM, Heintzelman MB (1991) *Curr Top Membr* **38**: 31-55
- Baryko B, Wagner MC, Reizes O, Albanesi JP (1992) *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 490-494
- Colluccio LM (1991) *Eur J Cell Biol* **56**: 296-294
- Kohama K, Lin Y, Takano-Ohmuru H, Ishikawa R (1991) *J Cell Sci* **14**: (suppl): 59-61
- Adams RJ, Pollard TD (1989) *Nature* (Lond) **340**: 565-568
- Miyata H, Bowers B, Korn ED (1989) *J Cell Biol* **109**: 1519-1528
- Brzeska H, Lynch TJ, Korn ED (1988) *J Biol Chem* **263**: 427-435
- Kulesza-Lipka D, Baines IC, Brzeska H, Korn ED (1991) *J Cell Biol* **115**: 109-119
- Fukui Y, Lynch TJ, Brzeska H, Korn ED (1989) *Nature* (Lond) **341**: 328-331
- Baines IC, Korn ED (1990) *J Cell Biol* **111**: 1895-1904

39. Baines IC, Brzeska H, Korn ED (1992) *J Cell Biol* **119**: 1193-1203
40. Jung G, Hammer JA III (1990) *J Cell Biol* **110**: 1955-1964
41. Wessels D, Murray J, Jung G, Hammer JA III, Soll DR (1991) *Cell Motil Cytoskel* **20**: 301-315
42. Doberstein SK, Baines IC, Wiegand G, Korn ED, Pollard TD (1993) *Nature (Lond)* **365**: 841-843
43. Collins K, Sellers JR, Matsudaira P (1990) *J Cell Biol* **110**: 1137-1147
44. Halsall DJ, Hammer JA III (1990) *FEBS Lett* **267**: 126-130
45. Cheney RE, Mooseker MS (1992) *Curr Opin Cell Biol* **4**: 27-35
46. Motell C, Rubin G (1988) *Cell* **52**: 757-772
47. Porter J, Hicks JL, Williams DC, Montell C (1992) *J Cell Biol* **116**: 683-694
48. Horowitz JA, Hammer JA III (1990) *J Biol Chem* **265**: 20646-20652
49. Mercer JA, Seperack PT, Strobel MC, Copeland NG, Jenkins NA (1991) *Nature (Lond)* **349**: 709-713
50. Johnston GC, Prendergast JA, Singer RA (1991) *J Cell Biol* **113**: 539-551
51. Larson RE, Espindola FS, Espreafico EM (1990) *J Neurochem* **54**: 1288-1294
52. Cheney RE, O'Shea MK, Heuser JE, Coelho MV, Wolensky JS, Espreafico EM, Forscher P, Larson RE, Mooseker MS (1993) *Cell* **75**: 13-23
53. Espindola FS, Espreafico EM, Coelho MV, Martins AR, Costa FRC, Mooseker MS, Larson RE (1992) *J Cell Biol* **118**: 359-363
54. Espreafico EM, Cheney RE, Matteoli M, Nascimento AAC, De Camilli PV, Larson RE, Mooseker MS (1992) *J Cell Biol* **119**: 1541-1557
55. Kellerman KA, Miller KG (1992) *J Cell Biol* **119**: 823-834
56. Husson TB, Mooseker MS (1992) *Molec Biol Cell* **3** (suppl): 158a
57. Chen T-I, Edwards KA, Lin RC, Coats LW, Kiehart DP (1991) *J Cell Biol* **115** (suppl): 330a
58. Knight AE, Kendrick-Jones J (1993) *J Mol Biol* **231**: 148-154
59. Goldstein LSB (1991) *Trends Cell Biol* **1**: 93-98
60. Walker RA, Sheetz MP (1993) *Annu Rev Biochem* **62**: 429-451
61. Endow SA (1992) *Annu Rev Biol* **8**: 29-66
62. Vale RD, Reese TS, Sheetz MP (1985) *Cell* **60**: 883-885
63. Kuzniecova SA, Gelfand V (1986) *Proc Natl Acad Sci USA* **83**: 8530-8534
64. Collins CA, Vallee RB (1989) *Cell Motil Cytoskel* **14**: 491-500
65. Hasanga S, Murofushi H, Okuhara K, Sato R, Masuda Y, Sakai H, Hirokawa N (1989) *Cell Motil Cytoskel* **12**: 264-272
66. Porter ME, Scholey JM, Stemple DL, Vigers GPA, Vale RD, Sheetz MP, McIntosh JR (1987) *J Biol Chem* **262**: 2794-2802
67. Dabora SL, Sheetz MP (1988) *Cell Motil Cytoskel* **10**: 482-495
68. Saxton WH, Porter ME, Cohn SA, Scholey JM, Raff EC, McIntosh JR (1988) *Proc Natl Acad Sci USA* **85**: 1109-1113
69. Kachar B, Albanesi JP, Fujisaki H, Korn ED (1987) *J Biol Chem* **262**: 16180-16185
70. McCaffrey G, Vale RD (1989) *EMBO J* **8**: 3229-3234
71. Hackney DD, Levitt JD, Suhan J (1992) *J Biol Chem* **267**: 8696-7001
72. Toyoshima I, Yu H, Steuer ER, Sheetz MP (1992) *J Cell Biol* **118**: 1121-1131
73. Lasek RJ, Brady ST (1985) *Nature (Lond)* **316**: 645-647
74. Hollenbeck PJ, Swanson JA (1990) *Nature (Lond)* **346**: 864-866
75. Hirokawa N, Sato YS, Kobayashi N, Pfister KK, Bloom GS (1991) *J Cell Biol* **114**: 295-302
76. Vale RD, Hotani H (1988) *J Cell Biol* **107**: 2233-2241
77. Rodionov VI, Gyoeva FK, Gelfand VI (1991) *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 4956-4960
78. Enos AP, Morris NR (1990) *Cell* **60**: 1019-1027
79. Hagan I, Yanagida M (1990) *Nature (Lond)* **347**: 563-566
80. Le Guellec R, Paris J, Couturier A, Roghi C, Philippe M (1991) *Moll Cell Biol* **11**: 3395-3398
81. Meluh PB, Rose MD (1990) *Cell* **60**: 1029-1041
82. Endow SA, Henikoff S, Soler-Niedziela L (1990) *Nature (Lond)* **345**: 81-83
83. Walker RA, Salmon ED, Endow SA (1990) *Nature (Lond)* **347**: 780-782
84. Zang P, Knowles BA, Goldstein LSB, Hawley RS (1990) *Cell* **62**: 1053-1062
85. Hall DH, Hedgecock EM (1991) *Cell* **65**: 837-847
86. Endow SA, Hasumi M (1991) *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 4424-4427
87. Stewart RJ, Pesavento PA, Woerpel DN, Goldstein LSB (1991) *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 8470-8474
88. Hoyt MA, He L, Loo KK, Saunders WS (1992) *J Cell Biol* **118**: 109-120
89. Roof DM, Meluh PB, Rose MD (1992) *J Cell Biol* **118**: 95-108
90. Vallee RB (1991) *Trends Cell Biol* **1**: 25-29
91. Asai DJ (1986) *Develop Biol* **118**: 416-424
92. Vallee RB, Wall JS, Paschal BM, Shpetner HS (1988) *Nature (Lond)* **332**: 561-563
93. Neely MD, Boekelheide K (1988) *J Cell Biol* **107**: 1767-1776
94. Lye RJ, Porter ME, Scholey JM, McIntosh JR (1987) *Cell* **51**: 309-318
95. Schnapp BJ, Reese TS (1989) *Proc Natl Acad Sci USA* **86**: 1548-1552
96. Scholey JM, Neighbors B, McIntosh JR, Salmon ED (1984) *J Biol Chem* **259**: 6516-6525
97. Schroeder CC, Fok AK, Allen RD (1989) *J Cell Biol* **109**: 157a
98. Euteneuer U, Koonce MP, Pfister KK, Schliwa M (1988) *Nature (Lond)* **332**: 176-178
99. Koonce MP, Jeffries J, McIntosh JR (1990) *Cell Motil Cytoskel* **15**: 51-62
100. Pfarr CM, McIntosh JR (1988) *J Cell Biol* **107**: 244a
101. Paschal BM, Shpetner HS, Vallee RB (1987) *J Cell Biol* **105**: 1273-1282
102. Gibbons IR, Gibbons BH, Mocz G, Asai DJ (1991) *Nature (Lond)* **352**: 640-643
103. Ogawa K (1991) *Nature (Lond)* **252**: 643-645
104. Forman DS, Brown KJ, Livengood (1983) *J Neurosci* **3**: 1279-1288
105. Forman DS, Brown KJ, Promersberger ME (1983) *Brain Res* **272**: 194-197
106. Pfarr CM, Coue M, Grissom PM, Hays TS, Porter ME, McIntosh JR (1990) *Nature (Lond)* **345**: 263-265
107. Steuer E, Wordeman L, Schroer TA, Sheetz MP (1990) *Nature (Lond)* **345**: 266-268
108. Goltz JS, Wolkoff AW, Novikoff PM, Stockert RJ, Satir P (1992) *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 7026-7030
109. Paschal BM, Holzbaur EL, Pfister KK, Clark S, Meyer DJ, Vallee RB (1993) *J Biol Chem* **268**: 15318-15323
110. Gill SR, Schroer TA, Szilak I, Steuer ER, Sheetz MP, Cleveland DW (1993) *J Cell Biol* **115**: 1639-1650
111. Pierre P, Scheel J, Rickard JE, Kreis TE (1992) *Cell* **70**: 887-900
112. Goldstein LSB, Vale RD (1991) *Nature (Lond)* **352**: 569-570
113. Johnson KA (1985) *Annu Rev Biophys Chem* **14**: 161-168
114. Hackney DD (1988) *Proc Natl Acad Sci USA* **85**: 6314-6318
115. Shimizu T, Furusawa K, Ohashi S, Toyoshima Y, Okuno M, Malik F, Vale RD (1991) *J Cell Biol* **112**: 1189-1197
116. Inoue S (1986) *Video Microscopy*, Plenum Press, N. York
117. Makuch R, Stępkowski D (1993) *Acta Biochim Polon* **40**: 353-362
118. Vallee RB, Shpetner HS, Paschal BM (1989) *Trends Neurosci* **12**: 65-70
119. Stewart RJ, Thaler JP, Goldstein LSB (1993) *Proc Natl Acad Sci USA* **90**: 5209-5213
120. Lillie SH, Brown S (1992) *Nature (Lond)* **356**: 358-361

Proteoglikany heparanosiarczanowe — i ich rola w organizmie

Heparan sulphate proteoglycans and their role in the organism

EWA MARIA KOŹMA¹
KRYSTYNA OLCZYK²

Spis treści:

- I. Wprowadzenie
- II. Struktura HSPG i ich metabolizm
- III. Interakcje HSPG z makrocząsteczkami
- IV. HSPG macierzy zewnątrzkomórkowej
- V. Rola HSPG w oddziaływaniach między komórką a macierzą zewnątrzkomórkową — zjawiska przylegania i migracji komórek
- VI. Wpływ HSPG na wzrost i różnicowanie komórek

Wykaz stosowanych skrótów: HSPG — proteoglikany heparanosiarczanowe; FGF — czynnik wzrostowy fibroblastów; aFGF — kwaśny czynnik wzrostowy fibroblastów; bFGF — zasadowy czynnik wzrostowy fibroblastów; GlcA — kwas glukuronowy; GlcNAc — N-acetyloglukozoamina; N-CAM — błonowe receptory adhezyjne neuronów

I. Wprowadzenie

Proteoglikany heparanosiarczanowe (HSPG) są glikoproteinami cechującymi się znaczną heterogennością, szeroko rozpowszechnionymi w tkankach zwierzęcych [1-4]. Występują one w komórkach jak i w przestrzeni pozakomórkowej. W komórkach związane są głównie z błonami zewnętrznymi [1, 3-5] i ziarnistościami wydzielniczymi [4-6], a produkty ich częściowej degradacji znajdują się także w jądrze komórkowym [7]. W przestrzeni pozakomórkowej natomiast, omawiane makrocząsteczki wchodziły w skład macierzy zewnątrzkomórkowej i błon podstawnych [2, 6, 8, 9]. Istnieją przesłanki, sugerujące, że HSPG mogą odgrywać istotną rolę w regulacji oddziaływania komórek ze środowiskiem zewnętrznym, wpływając na wzrost i procesy różnicowania komórek. Do przypuszczeń takich skłaniają:

1. wymieniona wyżej lokalizacja poza- i wewnątrzkomórkowa HSPG lub produktów ich rozpadu,
2. pojawianie się HSPG na określonych etapach morfogenezy [1, 3, 9, 10],

Contents:

- I. Introduction
- II. HSPG structure and metabolism
- III. Interactions of HSPG with macromolecules
- IV. HSPG of extracellular matrix
- V. Role of HSPG in interactions between cell and extracellular matrix — cell adhesion and migration
- VI. Influence of HSPG on cell growth and differentiation

3. pewne cechy struktury omawianych proteoglikanów, takie, jak znaczna gęstość ładunku elektrycznego części cukrowej, umożliwiającą specyficzne bądź niespecyficzne oddziaływania z wieloma różnymi molekułami i duża różnorodność budowy [2, 11].

II. Struktura HSPG i ich metabolizm

Cząsteczki HSPG składają się z dwóch części: rdzenia białkowego i kowalencyjnie z nim związanych, poprzez grupę hydroksylową reszty serynowej, łańcuchów siarczanu heparanu o różnej długości. Liczba łańcuchów glikanowych może być różna — od jednego do kilku, a nawet do 30, jak w przypadku HSPG z hodowli nowotworowych komórek okrężnicy człowieka. Zdarza się także, że do jednej cząsteczki białka rdzeniowego, obok łańcuchów siarczanu heparanu, może być przyłączony siarczan chondroityny. Wspomniany układ występuje w przypadku: syndekanów 1 i 3 (błonowych proteoglikanów, syntetyzowanych przez różnorodne komórki różnicujące się oraz przez nabłonki) [1,9-1,2], CD-44 (receptora zasiedlania limfocytów) [4, 13] czy betaglikanu (receptora dla transformującego czynnika wzrostowego β i zasadowego czynnika wzrostowego fibroblastów) [14].

Prócz łańcuchów glikanowych, białka rdzeniowe mają jeszcze łańcuchy oligosacharydowe, przyłączone do reszt asparaginy i seryny za pomocą wiązań N- i O-glikozydowych. Masy cząsteczkowe tak zbudowanych molekuł HSPG z hepatocytów szczura wynoszą 73 kDa, a z komórek nowotworowych okrężnicy człowieka nawet 950 kDa [2].

¹ Mgr, ² doc. dr hab., Katedra i Zakład Chemii Klinicznej i Diagnostyki Laboratoryjnej, Śląska Akademia Medyczna, ul. Jagiellońska 4, 41-200 Sosnowiec

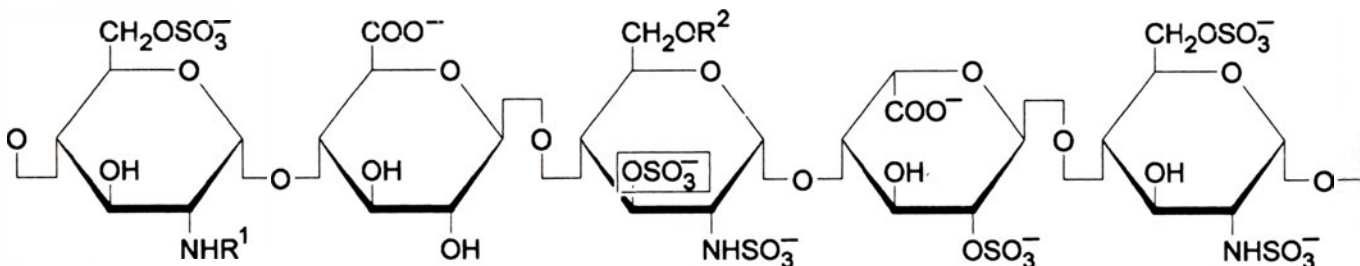
Poznano już budowę pierwszorzędową różnych białek rdzeniowych wielu HSPG [1, 4, 9]. Nie znaleziono jednak sekwencji aminokwasowej, która ściśle determinowałaby przyłączenie łańcucha glikoaminoglikanowego. Tym niemniej, analiza struktury białek rdzeniowych ujawniła, że reszty seryny wbudowane w odcinki peptydowe o konformacji β , są szczególnie często podstawiane łańcuchami cukrowymi [11].

Białka rdzeniowe, prócz stref wiążących łańcuchy siarczanu heparanu, zawierają obszary pełniące inne funkcje np.: kotwiczenie w błonach komórkowych czy pośredniczenie w interakcjach z białkami substancji podstawowej. Niektóre białka rdzeniowe proteoglikanów wykazują znaczną strukturalną homologię z innymi cząsteczkami. I tak, białko rdzeniowe HSPG błon podstawnych zawiera regiony o dużym podobieństwie do lamininy czy do tzw. cząsteczki N-CAM odpowiedzialnej za adhezję komórek nerwowych [8, 11]. Sugeruje się, że owe obszary białek rdzeniowych są odpowiedzialne za zdolność tych HSPG do samoagregacji.

Prekursory białek rdzeniowych, syntetyzowane w szorstkiej siateczce śródplazmatycznej, podlegają tam wstępnym modyfikacjom [2, 5, 11, 15]. Modyfikacje te polegają na przyłączeniu łańcuchów oligosacharydowych do grupy amidowej asparaginy, występującej w układzie Asn-X-Ser (Thr) (gdzie X — dowolny aminokwas). Następnie, po przetransportowaniu do aparatu Golgiego, omawiane prekursory są poddawane dalszej obróbce, która obejmuje: modyfikacje N-glikozydowo połączonych oligosacharydów, syntezę oligosacharydów przyłączonych poprzez wiązanie O-glikozydowe i wreszcie, syntezę łańcuchów glikoaminoglikanowych. Ostatni z wymienionych procesów zaczyna się od rozpoznania przez ksylozylotransferazę odpowiednich reszt seryny białka rdzeniowego i przeniesienia na nie reszty ksylozy. Do tej zaś przyłączają się, przenoszone z odpowiednich UDP-pochodnych przy udziale transferaz o różnej specyficzności, dwie reszty galaktozy i jedna kwasu glukuronowego. Utworzona tetrasacharydowa sekwencja stanowi region łączący część białkową z komponentem cukrowym. Dalsze wydłużenie łańcucha cukrowego jest wynikiem katalizowanego enzymatycznie, naprzemiennego przyłączania do końca nieredukującego tego łańcucha, reszt N-acetyloglukozoaminy

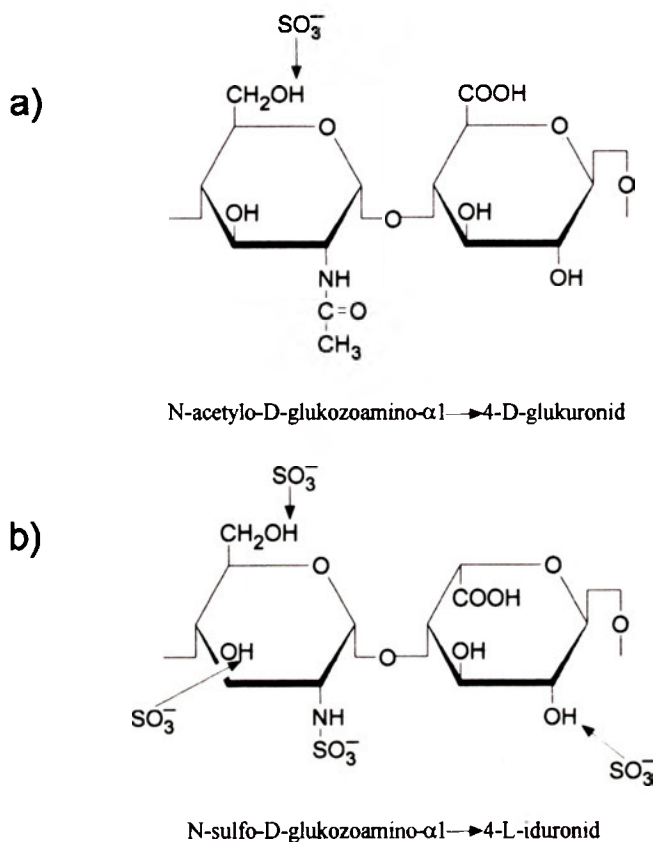
i kwasu glukuronowego. Powstające polimery o różnej masie cząsteczkowej, zbudowane są z jednostki podstawowej o strukturze $[GlcA \xrightarrow{\beta 1,4} GlcNAc \xrightarrow{\alpha 1,4}]$. Te polisacharydowe szkielety w cysternach aparatu Golgiego podlegają dalszym, intensywnym przemianom, zachodzącym w ściśle określonym porządku [2, 11, 15]. Przemiany te, katalizowane przez enzymy modyfikujące, obejmują N-deacetylację reszt glukozoaminy z jej następowym siarczanowaniem przy grupie aminowej, epimeryzację sąsiednich reszt kwasu glukuronowego z powstaniem kwasu iduronowego, a wreszcie wprowadzenie grup siarczanowych w pozycje ugrupowań 2-O-kwasu iduronowego i 6-O-glukoaminy. Rzadko zdarzają się inne O-siarczanowane pochodne reszt cukrowych, obejmujące na przykład 3-O-siarczanowaną-N-siarczanowaną glukozoaminę czy 2-O-siarczanowany kwas glukuronowy. Te nietypowo siarczanowane reszty odgrywają ważne biologiczne funkcje. I tak, 3-O-siarczanowana glukozoamina stanowi centralną i zasadniczą część pentasacharydu swoiście wiążącego antytrombinę III [2, 11, 16]. Takie pentasacharydowe struktury, których budowę przedstawia wzór 1, związane są z podfrakcją HSPG, wytwarzaną przez komórki śródbłonna naczyniowego [1, 2, 11, 16]. Z kolei, 2-O-siarczanowany kwas glukuronowy występuje szczególnie często w łańcuchach siarczanu heparanu, znajdujących w jądrze komórkowym hepatocytów i biorących prawdopodobnie udział w regulacji procesów proliferacyjnych [7]. Niejasne są mechanizmy odpowiadające za powstawanie owych rzadkich ugrupowań. Wydaje się, przynajmniej w przypadku pentasacharydu wiążącego antytrombinę, że powstaje on w wyniku działania oddzielnie zlokalizowanego w aparacie Golgiego, specjalnego kompleksu enzymów modyfikujących [5].

Etapem niezbędnym do opisanego wcześniej ciągu modyfikacji łańcucha glikoaminoglikanowego jest N-deacetylacja i N-siarczanowanie reszt glukozoaminy. Są jednak regiony łańcucha, które z niewiadomych przyczyn nie ulegają tym procesom, a co za tym idzie, nie podlegają także żadnym dalszym zmianom. Konsekwencją tego jest powstanie w obrębie jednego łańcucha siarczanu heparanu obszarów o niskim stopniu siarczanowania, dużej zawartości jednostek N-acetyloglukozoaminy i kwasu glukuronowego oraz regionów wysoce zmodyfikowanych, z dużą ilością



Wzór 1. Sekwencja pentasacharydowa, występująca w niektórych subpopulacjach siarczanu heparanu i heparyny, wiążąca swoiście antytrombinę III. W pozycji R_1 może występować grupa $-SO_3^-$ lub $-COCH_3$, a w pozycji R_2 -H lub $-SO_3^-$. Charakterystyczna, centralnie usytuowana reszta N-siarczano-3-O-siarczano-glukoaminy jest niezbędna do promowania tego połączenia.

reszt kwasu iduronowego i grup siarczanowych [2, 11, 15]. Te różniące się stopniem modyfikacji domeny mają różne rozmiary i różną lokalizację na łańcuchu polisacharydowym, co pociąga za sobą dużą strukturalną heterogenność tegoż łańcucha. Budowę sekwencji disacharydowych, wchodzących w skład omawianych wyżej domen, przedstawia wzór II.



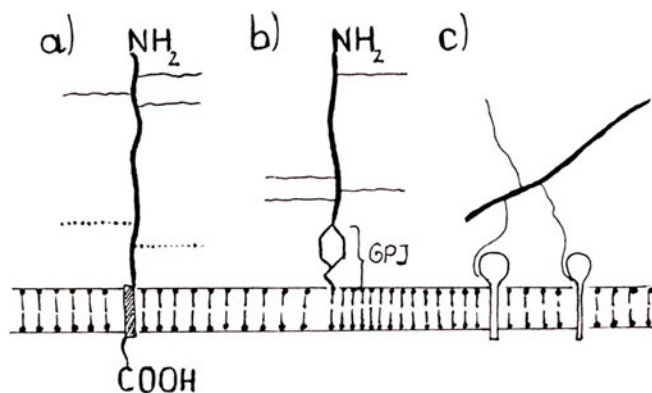
Wzór II. Sekwencje disacharydowe budujące łańcuch siarczanu heparanu:

- sekwencje, które nie uległy procesom modyfikacyjnym
- sekwencje zmodyfikowane. Strzałkami oznaczono grupy hydroksylowe mogące podlegać siarczanowaniu.

Siarczany heparanu o wysokim stopniu N-siarczanowania i dużej zawartości kwasu iduronowego, produkowane przez mastocyty, określane są mianem heparyny [2, 6, 11]. Glikoaminoglikan ten, którego metabolizm oraz funkcje omówiono w piśmiennictwie polskim w paru opracowaniach poglądowych [17, 18], wykazuje, mimo szeregu funkcjonalnych podobieństw z HSPG, także pewne różnice działania. I tak na przykład heparyna, w odróżnieniu od HSPG, oddziałuje z lipoproteinami o małej gęstości (LDL) [19].

Siarczanowanie jest ostatnim etapem modyfikacji HSPG. Następnie większość tych związków jest transportowana z pęcherzykami wydzielniczymi do błony komórkowej [20], gdzie, w zależności od rodzaju komórek, cząsteczki te są w różny sposób wiązane. Wyróżnia się trzy typy powiązania HSPG z błonami komórkowymi, co ilustruje Ryc. 1:

- HSPG mogą być bezpośrednio wbudowane w podwójną warstwę fosfolipidów — białko rdzeniowe jest tu czynnikiem kotwiczącym. Są to



Ryc. 1. Sposoby powiązania HSPG z błoną komórkową:

- HSPG wbudowane w błonę (transmembranowe)
 - HSPG połączone z błoną poprzez glikozylfosfatydyloinozytol (GPI)
 - HSPG połączone z błoną za pośrednictwem oddziaływań między ich łańcuchami siarczanu heparanu a receptorami błony komórkowej.
- Pogrubionymi liniami oznaczono białka rdzeniowe HSPG, linie cienkie obrazują łańcuchy siarczanu heparanu, a kropkowane — łańcuchy siarczanu chondroityny.

tw. HSPG transmembranowe. Najlepiej poznаныmi przedstawicielami są tu: rodzina syndekanów, betaglikan oraz receptor zasiedlania limfocytów CD-44 [1, 3, 4]

- HSPG mogą wiązać się z błoną za pośrednictwem kowalencyjnego wiązania między białkiem rdzeniowym i błonowym glikozylfosfatydyloinozytalem [21].
- HSPG mogą wreszcie łączyć się w sposób mniej lub bardziej swoisty za pomocą swoich łańcuchów siarczanu heparanu z różnymi cząsteczkami błon komórkowych. Są to HSPG zewnątrzmembranowe [5, 6, 20, 22].

Proteoglikany transmembranowe oraz te, związane z błoną przez glikozylfosfatydyloinozytol, cechują się średnim okresem półtrwania na powierzchni komórki od 3 do 8 godzin. Po tym czasie mogą, zależnie od typu komórki, albo, po enzymatycznym odcięciu, być „zrzućcane” do przestrzeni zewnątrzkomórkowej, albo podlegać endocytozie i wewnątrzkomórkowej degradacji [3, 5, 9, 20]. Pojawiły się jednakże doniesienia, że w przypadku komórek przytarczyc szczura oraz komórek śródbłonna naczyń, w warunkach *in vitro*, przynajmniej część internalizowanych błonowych HSPG może wrócić ponownie na powierzchnię błony [5, 9, 23]. W komórkach śródbłonna naczyń opisanemu zjawisku krążenia podlegają proteoglikany heparanosiarczanowe związane z lipazą lipoproteinową [23]. Znaczenie tego faktu pozostaje niejasne. Być może jest to sposób regulacji puli czynnego enzymu.

Dwie niezależne ścieżki degradacyjne HSPG opisano w komórkach ziarnistych jajników szczura [5, 20]. Pierwsza (tzw. ścieżka szybka) jest przeznaczona wyłącznie do katabolizmu HSPG związanych z błoną za pośrednictwem glikozylfosfatydyloinozytola. Endocytywane proteoglikany są transportowane do lizosomów, gdzie podlegają szybkiej enzymatycznej degradacji. Inaczej wygląda katabolizm HSPG transmem-

branowych (wbudowanych w błony). Po endocytozie podlegają one procesom stopniowego rozpadu co najmniej w trzech oddzielnych kompartmentach o różnym pH. W przypadku omawianej ścieżki degradacyjnej oznaczono pośrednie produkty rozpadu w postaci łańcuchów siarczanu heparanu o masie 10 kDa i około 5 kDa. Mogą one podlegać kumulacji w komórce. Znaczenie tego procesu nie jest w pełni jasne. W przypadku hepatocytów stwierdzono [7], że takie gromadzące się subpopulacje krótkołańcuchowego siarczanu heparanu, zawierające przy tym dużo reszt 2-O-siarczanowanego kwasu glukuronowego, są transportowane do jądra, gdzie regulują prawdopodobnie aktywność proliferacyjną komórki. Mechanizm przeniesienia tych cząsteczek do jądra pozostaje niejasny. Możliwe, że wymagane jest sprzężenie fragmentów heparanowych z białkami działającymi w jądrze, na przykład czynnikiem wzrostowym fibroblastów [5, 24].

III. Interakcje HSPG z różnymi cząsteczkami

HSPG oddziałują z cząsteczkami wielu typów. W interakcjach tych może brać udział albo część cukrowa, albo białkowa omawianych proteoglikanów [2, 11, 13, 25]. Najczęściej jednak dla zaistnienia określonego efektu biologicznego wymagane jest współdziałanie obu tych komponentów [11, 25].

Intrakcje, w których ze strony HSPG uczestniczą łańcuchy cukrowe, mają charakter oddziaływań elektrostatycznych, nie wymagających specjalnej struktury szkieletów węglowodanowych (wyjątki — wiązanie antytrombiny III i czynnika wzrostowego fibroblastów) [26, 27]. Biorące udział w powyższych reakcjach białka, zawierają w miejscach oddziaływania z siarczanem heparanu charakterystyczne ugrupowania aminokwasów zasadowych, zwane sekwencjami zgodności [28]. Powstające połączenia odznaczają się niską

stałą dysocjacji rzędu 1 do 5 nM [1].

Białka rdzeniowe uczestniczą w różnych oddziaływaniach HSPG. Mogą one kotwiczyć składniki cukrowe proteoglikanów w określonych miejscach (na błonie komórkowej lub w przestrzeni pozakomórkowej), nadając jednocześnie łańcuchom siarczanu heparanu niezbędną do reakcji orientację przestrzenną [11, 25]. Białka rdzeniowe mogą także uczestniczyć np. w transdukcji sygnałów z przestrzeni zewnętrznej, poprzez łańcuchy siarczanu heparanu, do wnętrza komórki [1, 10, 11, 13]. Mogą one w końcu reagować z różnymi cząsteczkami niezależnie od części cukrowej HSPG [8, 9, 11, 23].

Przykłady oddziaływań między HSPG a różnymi rodzajami cząsteczek zamieszczono w tabeli 1.

IV. HSPG macierzy zewnątrzkomórkowej

Przestrzeń zewnątrzkomórkowa w tkankach wypełniona jest tzw. macierzą. Jest to mieszanina wielocząsteczkowych, oddziałujących ze sobą białek (głównie złożonych) [8, 25, 29]. Makrocząsteczki te tworzą struktury fibrylarne lub błonowe (włókna kolagenowe i elastynowe), albo wchodzi w skład koloidalnej tzw. substancji podstawowej (glikoproteiny i proteoglikany).

Macierz, wytwarzana przez komórki nabłonkowe i śródbłonkowe, zorganizowana jest w postaci błon podstawnych [1, 8, 9]. Głównymi proteoglikanami tych błon są HSPG [8]. Ze względu na strukturę można wyróżnić:

1. HSPG zawierające białko rdzeniowe o znacznej masie, z kilkoma domenami globularnymi, oraz 3 łańcuchy heparanowe. Proteoglikany te występują także w macierzy pozakomórkowej, syntetyzowanej przez inne niż nabłonki, typy komórek [8, 9].
2. HSPG o znacznej zawartości siarczanu heparanu, przy stosunkowo niewielkiej masie cząstecz-

Tabela 1.

Interakcje HSPG z różnymi cząsteczkami

Nazwa cząsteczki	Znaczenie interakcji z HSPG	Piśmiennictwo
białka macierzy międzykomórkowej: laminina, fibronektyna, trombospondyna, tenascyna, kolageny typu I, III i V	wzrost spoistości substancji międzykomórkowej, adhezja komórek, wpływ na organizację cytoszkieletu	[1-3, 6, 8, 9, 12, 13, 19, 25, 36-38]
czynniki wzrostowe i cytokiny: interferon gamma, kwaśny i zasadowy czynnik wzrostowy fibroblastów, siatkówkowy czynnik odżywczy, czynnik wzrostowy hepatocytów, czynnik wzrostowy komórek Schwanna	ochrona czynników wzrostowych przed proteolizą i magazynowanie ich w macierzy pozakomórkowej, HSPG — ko-receptorami dla czynników wzrostowych fibroblastów	[1, 10, 12, 13, 25, 27, 30, 39]
serpiny: antytrombina III, heparanowy kofaktor II, neksyna-1	zwiększenie powinowactwa serpin do trombiny	[11, 16, 25, 49]
zewnątrzkomórkowa dysmutaza ponadtlenkowa	kotwiczenie na powierzchni komórek i w macierzy pozakomórkowej	[16, 50]
lipaza lipoproteinowa	kotwiczenie na powierzchni komórek śródbłonka, ochrona przed proteolizą	[11, 23, 25]
elastaza leukocytarna	hamowanie aktywności enzymu	[24]
witronektyna	regulacja aktywności układu dopełniacza	[1, 16]
białka płaszczki wirusów HIV i HSV	zwiększenie inwazyjności wirusów	[25, 51]

kowej białka rdzeniowego; prócz wymienionego glikanu niesie on także łańcuchy siarczanu chondroityny [8, 9].

HSPG macierzy zewnątrzkomórkowej spajają składniki tej macierzy, regulują przepuszczalność błon podstawnych, modulują działanie inhibitorów proteaz (neksyny-1 i heparynowego kofaktora II) a także wiążą niektóre czynniki wzrostowe, co powoduje ich izolację od powierzchni komórki [2, 8, 9, 13, 16, 25, 27, 30].

Obserwowana w miejscach tworzenia przerzutów nowotworowych, utrata spistości błon podstawnych naczyń krwionośnych jest wynikiem wydzielania przez komórki nowotworowe endoglukozydaz (heparanaz), hydrolizujących HSPG tych błon [31]. Zjawisko upośledzenia funkcji spajającej omawianych HSPG, oparte na podobnym mechanizmie, występuje podczas wędrówki aktywowanych limfocytów T do ognisk zapalnych w tkankach [32].

Wpływ HSPG błon podstawnych na przepuszczalność tych błon wydaje się szczególnie istotny w przypadku cukrzycy. U cukrzyków dochodzi do spadku stopnia siarczanowania składnika cukrowego proteoglikanów z jednoczesnym spadkiem zawartości HSPG błon podstawnych kłębuszków nerkowych. Powoduje to wzrost przepuszczalności tych błon i utratę z moczem białek osocza krwi [33-35].

V. Rola HSPG w oddziaływaniach między komórką a macierzą zewnątrzkomórkową — zjawiska przylegania i migracji komórek

Na granicy komórka-środowisko zewnętrzne (macierz zewnątrzkomórkowa, inne komórki) odbywa się ciągły, dwukierunkowy przepływ informacji, polegający na odbieraniu bodźców zewnętrznych oraz adaptacyjnej reakcji komórki. Molekułami odgrywającymi istotną rolę w omawianych zjawiskach są transmembranowe proteoglikany, głównie HSPG. Najlepiej poznanymi transmembranowymi HSPG są syndekany, pojawiające się bardzo wcześnie w rozwoju embrionalnym [1, 3, 4, 9, 10, 12]. Syndekany gromadzą się na pewnych obszarach błon komórkowych, gdzie łącząc się ze składnikami substancji podstawowej (głównie fibronektyną), biorą udział w tworzeniu miejsc ogniskowego przylegania komórki do podłoża, zwanych inaczej płytkami przylegania [1, 36-38]. Syndekany, dzięki zdolnościom do samoagregacji, mogą także stabilizować miejsca kontaktu komórka — komórka [1-3, 13, 19].

Udział syndekanów w zjawisku adhezji wydaje się być jednak tylko mechanizmem pomocniczym, uzupełniającym specyficzne oddziaływania głównie komórkowych receptorów integrynowych z fibronektyną [13, 37, 38]. Zasadnicze znaczenie interakcji syndekanów ze składnikami macierzy zewnątrzkomórkowej wydaje się sprowadzać do wpływu na organizację mikrofilamentów aktynowych cytoszkieletu [1, 19, 36, 37].

Istotą powyższego zjawiska jest udział syndekanów w przenoszeniu sygnału między mikrootoczeniem a szkieletem komórki, co prowadzi do utrzymania przez nią określonego kształtu.

Zmiany kształtu komórek w procesie morfogenezy lub przy odbudowie tkanek, związane są z eliminacją syndekanów z powierzchni błon komórkowych [1, 10]. W przypadku natomiast zjawiska migracji komórek śródbłonna naczyniowego, dodatkowo obserwuje się zmiany typu proteoglikanów wytwarzanych przez zmiankowane komórki. Zmiany owe przejawiają się spadkiem produkcji HSPG, a nasileniem syntezy proteoglikanów chondroitynowych i dermatanosiarczanowych [19]. Rozpuszczalne proteoglikany chondroitynosiarczanowe blokują interakcje syndekanów i integryn z fibronektyną, powodując rozluźnienie kontaktu komórki z macierzą [13, 19].

Udział proteoglikanów heparanosiarczanowych w zjawiskach adhezji nie ogranicza się jedynie do oddziaływania tych cząsteczek z fibronektyną. W przypadku tkanki nerwowej, HSPG neuronów powodują zmiany konformacyjne błonowych receptorów adhezyjnych N-CAM, lub, jak to ma miejsce w siatkówce, wiążą się z białkami tzw. adheronu, uczestnicząc w ten sposób w zjawiskach przylegania komórek do siebie i do podłoża [2, 3, 6, 11, 25].

VI. Wpływ HSPG na wzrost i różnicowanie komórek

Komórki hodowane w obecności macierzy lub bez niej, posiadają odmienny fenotyp [25]. I tak np.: hepatocyty hodowane na podłożach stałych, pokrytych macierzą zewnątrzkomórkową zawierającą HSPG (lub heparynę), lamininę oraz kolagen typu IV, różnią się od komórek hodowanych bez macierzy. Komórki w kulturach zawierających macierz, mają kulisty kształt, wykazują mniejszą wrażliwość na czynniki wzrostowe, wytwarzają połączenia jonowo-metaboliczne (typu *neksus*) oraz syntetyzują białka charakterystyczne dla form zróżnicowanych [19, 25]. Wykazano, że trzy ostatnie cechy są bezpośrednio związane z obecnością w hodowlanym medium HSPG lub heparyny.

Mechanizmy, za pomocą których HSPG wpływają na procesy wzrostu i różnicowania komórek, nie są jeszcze dobrze poznane. Działanie HSPG wydaje się mieć kilka, omówionych poniżej, aspektów.

Cząsteczki HSPG błon podstawnych mogą wiązać niektóre czynniki wzrostowe (Tabela 1), chroniąc je przed enzymatyczną degradacją, ale jednocześnie blokując ich działanie na komórki [13, 25, 27, 30, 39]. Czynniki owe, uwalniane ze wspomnianych połączeń w wyniku działania enzymów proteolitycznych, heparanazy bądź obecności heparyny, mogą reagować z receptorami komórkowymi. Dobrze poznano 2 typy receptorów zasadowego czynnika wzrostowego fibroblastów (bFGF) [1, 10, 12, 27, 30]. Tak zwany receptor

typu I, o charakterze kinazy tyrozynowej, cechuje się wysokim powinowactwem przyłączania do bFGF. Receptor typu II, będący proteoglikanem heparano-siarczanowym błony komórkowej, choć wykazuje zdecydowanie niższe powinowactwo do omawianego czynnika, jest jednak niezbędny dla zaistnienia późniejszego wiązania bFGF z receptorem typu I. Błonowy HSPG odgrywa więc w wymienionym układzie rolę koreceptora bFGF. Znaczenie omawianej funkcji HSPG wydaje się być wielorakie. Sugeruje się, że powstanie kompleksu proteoglikan-bFGF może chronić czynnik przed enzymatyczną degradacją lub lokalnie zwiększać jego stężenie [5, 27]. Szczególnie jednak istotnym aspektem działania HSPG jest generowanie w związanej cząsteczce bFGF zmian konformacyjnych, niezbędnych do reakcji z receptorem o wysokim powinowactwie wiązania [10, 27]. Podobną funkcję wydaje się pełnić heparyna w stosunku do bFGF i aFGF w procesie angiogenezy [24].

Układ receptor-bFGF-HSPG ulega procesowi endocytozy. Prawdopodobnie wewnątrz komórki bFGF występuje już tylko w kompleksie z siarczanem heparanu [5, 20, 30]. Połączenie to wydaje się gwarantować ochronę omawianego czynnika przed wewnątrzkomórkową proteolizą. Przypuszczalnie też, kompleks bFGF-siarczan heparanu jest transportowany do jądra komórkowego — miejsca działania czynnika wzrostowego. Podobne mechanizmy wydają się leżeć u podstaw działania heparyny, stymulującej w obecności bFGF proliferację komórek śródbłonka naczyniowego w procesie angiogenezy [24, 40, 41]. Wpływ heparyny na procesy namnażania komórek jest jednak różny w zależności od rodzaju tkanki [11, 13, 19, 25]. W odróżnieniu od stymulującego wpływu na podziały (a także migracje) komórek śródbłonka naczyniowego, heparyna hamuje proliferację fibroblastów i komórek mięśni gładkich naczyń. Wykazano [25, 42], że heparyna blokuje indukowany działaniem estrów forbolu cykl komórkowy w późnej fazie G_1 (mięśnie gładkie) lub przy przejściu z fazy G_0 do fazy G_1 (fibroblasty). W wyniku działania heparyny, w obu przypadkach, nie dochodzi do ekspresji niezbędnych do proliferacji protoonkogenów *c-fos* i *c-myc* [42-44]. Zważywszy, że indukcja działania tych protoonkogenów przez estry forbolu odbywa się za pośrednictwem ścieżki zależnej od kinazy białkowej C, przyjmuje się [42, 43], że heparyna blokuje właśnie ten szlak na jednym z jego dalszych etapów. Prócz supresji wymienionych protoonkogenów, w obecności heparyny, w komórkach mięśniówki gładkiej obserwuje się zmiany biosyntezy i sekrecji trombospondyny, apolipoproteiny E, receptorów nabłonkowego czynnika wzrostowego — białek ważnych dla zjawisk adhezji i różnicowania komórek [19, 25].

Próby określenia strukturalnych cech heparyny-odpowiedzialnych za wyżej opisany efekt antyproliferacyjny- wskazały na O-siarczanowane fragmenty dedekasacharydowe, zawierające specyficzną resztę

3-O-siarczanowanej N-siarczanowanej glukozoaminy [45, 46]. Takie ugrupowania występują w obrębie łańcuchów siarczanu heparanu HSPG, produkowanych przez komórki śródbłonka naczyniowego [1, 19, 25]. Ten fakt sugeruje możliwość włączenia śródbłonka do kontroli procesów proliferacyjnych komórek mięśniówki gładkiej.

Wspomniany wcześniej, ambiwalentny wpływ heparyny na aktywność proliferacyjną różnych komórek ma jednak w warunkach fizjologicznych niewielkie znaczenie, ponieważ występowanie heparyny jest ograniczone. W odróżnieniu od heparyny, inne siarczany heparanu są w postaci proteoglikanów, szeroko rozpowszechnione w organizmach zwierzęcych [1-4]. HSPG, podobnie jak heparyna, mogą zarówno wzmacniać, jak i hamować podziały komórek. I tak, HSPG pochodzące z kultur hepatocytów rosnących wykładniczo, dodane do hodowli będących w fazie spoczynkowej, stymulują tam podziały komórek [46]. Jest to prawdopodobnie związane z opisanym wyżej zjawiskiem współdziałania HSPG i siarczanu heparanu z czynnikami wzrostowymi. Natomiast HSPG hepatocytów kultur stacjonarnych, dodane do hodowli hepatocytów intensywnie dzielących się, powodują zahamowanie ich podziałów, równoczesne ze wzrostem wewnątrzjądrowej zawartości siarczanu heparanu [47]. Jądrowa frakcja siarczanu heparanu, o dużej zawartości reszt 2-O-siarczanowanego kwasu glukuronowego, wydaje się pochodzić z HSPG, absorbowanych z hodowlanego medium i poddanych wewnątrz komórki częściowej enzymatycznej degradacji. Obniżenie stężenia omawianej frakcji przez dodanie do środowiska hodowlanego inozytolo-2-fosforanu, LiCl czy transformującego czynnika wzrostowego β , powodowało wzrost prędkości proliferacji komórek [48].

Wydaje się, że siarczan heparanu wpływa na zjawiska wzrostu komórek poprzez regulację ekspresji odpowiednich genów. Interesującą hipotezę, próbującą tłumaczyć regulacyjną rolę tego glikanu, przedstawili Busch i wsp. [25, 43, 44]. Według nich, występujący w jądrze siarczan heparanu, mający przecięź charakter polianionu, może oddziaływać z zasadowymi czynnikami transkrypcyjnymi. Konsekwencją tych interakcji mógłby być brak wiązania danych czynników transkrypcyjnych z odpowiednimi regionami promotorowymi DNA, a w wyniku tego zmiana ekspresji genów.

*Artykuł otrzymano 16 listopada 1993 r.
Zaakceptowano do druku 21 lutego 1994 r.*

Piśmiennictwo

1. Bernfield M, Kokenyesi R, Kato M (1992) *Annu Rev Cell Biol* 8: 365-93
2. Gallagher JT, Lyon M, Steward WP (1986) *Biochem J* 236: 313-325
3. David G (1991) *Biochem Soc Trans* 19: 816-820
4. Gallagher JT, Turnbull JE, Lyon M (1992) *Adv Exp Med Biol* 313: 49-57

5. Yanagishita M, Hascall VC (1992) *J Biol Chem* **267**: 9451-9454
6. Fransson LA (1987) *TIBS* **12**: 406-411
7. Fedarko NS, Conrad HE (1986) *J Cell Biol* **102**: 587-599
8. Paulsson M (1992) *Crit Rev Biochem Mol Biol* **27**: 93-127
9. David G (1992) *Adv Exp Med Biol* **313**: 69-78
10. McAlmon KR (1992) *Sem Perinatol* **16**: 90-96
11. Kjellen L, Lindahl U (1991) *Annu Rev Biochem* **60**: 443-475
12. Jalkanen M, Elenius K, Salmivirta M (1992) *Adv Exp Med Biol* **313**: 79-85
13. Ruoslahti E (1989) *J Biol Chem* **264**: 13369-13372
14. Lopez-Casillas F, Cheifetz S, Doody J, Andres JL, Lane WS, Massague J (1991) *Cell* **67**: 785-795
15. Stoddart RW (1984) w: *The Biosynthesis of Polysaccharides*, Macmillan Publishing Company, New York, str. 201-209
16. Bourin MC, Lindahl U (1993) *Biochem J* **289**: 313-330
17. Górski A (1990) *Pol Arch Med Wewn* **83**: 208-211
18. Roszkowska W, Worowski K (1984) *Post Hig Med Dośw* **38**: 73-124
19. Wight TN (1989) *Arteriosclerosis* **9**: 1-20
20. Yanagishita M (1992) *Adv Exp Med Biol* **313**: 113-120
21. Low MG (1989) *FASEB J* **3**: 1600-1608
22. Hook M, Kjellen L, Johansson S, Robinson J (1984) *Ann Biochem* **53**: 847-869
23. Saxena U, Klein MG, Goldberg IJ (1989) *J Biol Chem* **265**: 12880-12886
24. Folkman J, Shing Y (1992) *Adv Exp Med Biol* **313**: 355-364
25. Jackson RL, Busch SJ, Cardin AD (1991) *Physiological Rev* **71**: 481-525
26. Casu B (1991) *Sem Thrombosis and Hemostasis* **17** (Suppl. 1): 9-14
27. Gallagher JT, Turnbull JE (1992) *Glycobiology* **2**: 523-528
28. Cardin AD, Weintraub HJR (1989) *Arteriosclerosis* **9**: 21-32
29. Schuppan D, Riecken EO (1990) *Digestion* **46** (suppl 2): 2-11
30. Burgess WH, Maciąg T (1989) *Annu Rev Biochem* **58**: 575-606
31. Nakajima M, Irimura T, Nicolson GL (1988) *J Cell Biochem* **36**: 157-167
32. Ekre HS, Naparstek Y, Lider O, Hyden P, Hagermark O, Nilsson T, Vlodayvski I, Cohen I (1992) *Adv Exp Med Biol* **313**: 329-340
33. Klein DJ, Oegema TR, Brown DM (1989) *Diabetes* **38**: 130-139
34. Cohen MP, Klepser H, Wu VY (1988) *Diabetes* **37**: 1342-1327
35. Unger E, Pettersson I, Eriksson UJ, Lindahl U, Kjellen L (1991) *J Biol Chem* **266**: 8671-8674
36. Woods A, Couchman JR (1992) *Adv Exp Med Biol* **313**: 87-96
37. Ruoslahti E (1988) *Ann Rev Biochem* **57**: 375-413
38. Albelda SM, Buck C (1990) *FASEB J* **4**: 2868-2880
39. Folkman J, Klagsbrun M, Sasse J, Wadzinski M, Ingber D, Vlodayvsky I (1988) *Am J Pathol* **130**: 393-400
40. Folkman J (1985) *Biochem Pharmacology* **34**: 905-909
41. Russo J, Russo IH (1991) *Adv Exp Med Biol* **303**: 43-59
42. Castellot JJ, Pukac LA, Caleb BL, Wright TC, Karnovsky MJ (1989) *J Cell Biol* **109**: 3147-3155
43. Busch SJ, Jackson RL, Sassone-Corsi P (1990) *Trans Assoc Am Physicians* **103**: 21-27
44. Busch SJ, Martin GA, Barnhart RL, Mano M, Cardin AD, Jackson RL (1992) *J Cell Biol* **116**: 31-42
45. Wright TC, Castellot JJ, Petitou M, Lormeau JC, Choay J, Karnovsky MJ (1989) *J Biol Chem* **264**: 1534-1542
46. Castellot JJ, Choay J, Lormeau JC, Petitou M, Sache E, Karnovsky MJ (1986) *J Cell Biol* **102**: 1979-1984
47. Fedarko NS, Ishihara M, Conrad HE (1989) *J Cell Physiol* **139**: 287-294
48. Ishihara M, Fedarko NS, Conrad HE (1986) *J Biol Chem* **262**: 4708-4716
49. Cunningham DD, Wagner SL, Farrell DH (1992) *Adv Exp Med Biol* **313**: 297-305
50. Adachi T, Marklund SL (1989) *J Biol Chem* **264**: 8537-8541
51. Spear PG, Shieh MT, Herold BC, Wu Dunn D, Koshy TJ (1992) *Adv Exp Med Biol* **313**: 341-353

XXX ZJAZD P.T.BIOCH W 1994 ROKU

ZAWIADOMIENIE WSTĘPNE

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

w imieniu Komitetu
Organizacyjnego

Prof. zw. dr hab. A. Furowicz

Struktura, biosynteza i funkcja oligosacharydów glikohormonów

Structures, biosynthesis and function of glyco hormones oligosaccharides

IWONA ŻAK¹,
MARIAN DRÓŹDŹ²

Spis treści:

- I. Wprowadzenie
- II. Struktura hormonów glikoproteinowych
 - II-1. Struktura białkowa
 - II-2. Struktura oligosacharydów
- III. Biosynteza hormonów glikoproteinowych
- IV. Funkcja oligosacharydów hormonów glikoproteinowych
 - IV-1. Rola oligosacharydów w wiązaniu glikohormonów z docelowym receptorem oraz w transdukcji sygnału
 - IV-2. Rola oligosacharydów w metabolicznym obrocie glikohormonów

Contents:

- I. Introduction
- II. Structures of glycoprotein hormones
 - II-1. Protein structure
 - II-2. Oligosaccharide structure
- III. Biosynthesis of glycoprotein hormones
- IV. Functions of oligosaccharides in glycoprotein hormones
 - IV-1. Oligosaccharides and interaction with glyco hormones target receptor and their role in signal transduction
 - IV-2. Role of oligosaccharides in metabolic turnover system of glyco hormones

Wykaz stosowanych skrótów: h(e)CG — ludzka (końska) choriogonadotropina; h(e)(b)LH — ludzka, (końska), (wołowa) lutropina; hFSH — ludzka folitropina; hTSH — ludzka tyreotropina; RER — szorstka siateczka śródplazmatyczna; Man — mannoza; Gal — galaktoza; Fuc — fukoza; GlcNac — N-acetyloglukozamina; GalNac — N-acetylogalaktozamina; NeuAc = SA — kwas N-acetyloneuraminowy = kwas sjałowy; Asn — asparagina; Pro — prolina; Arg — arginina; Lys — lizyna; cAMP — cykliczny adenozy-nomonofosforan; GalNAc transferaza — N-acetylogalaktozaminotransferaza; S4GnM — sekwencja: SO₄-4GalNAcβ1.4GlcNacβ1.2Manα-; MCA — przeciwciała monoklonalne.

I. Wprowadzenie

Hormony glikoproteinowe tworzą blisko spokrewnioną rodzinę białek produkowanych w przysadce mózgowej i łożysku do której należy folitropina (FSH), lutropina (LH), tyreotropina (TSH) oraz choriogonadotropina kosmówkowa (CG). Ta ostatnia jako jedyna jest syntetyzowana poza przysadką, przez trofoblast w łożysku naczelnych i koni [1-4].

II. Struktura hormonów glikoproteinowych

II-1. Struktura białkowa

Każdy glikohormon (FSH, LH, TSH, CG) jest heterodimerem zawierającym wspólną dla wszystkich podjednostkę- α oraz odmienną, lecz homologiczną z innymi, hormonospecyficzną podjednostkę- β . Podjednostki te połączone są wiązaniami niekowalencyjnymi w aktywny holohormon. Ekspresja aktywności biologicznej hormonu wymaga interakcji obu podjednostek.

W obrębie danego gatunku zwierzęcia podjednostki- α mają identyczną strukturę I rzędową, natomiast pochodzące od różnych gatunków przejawiają dużą homologię sekwencji aminokwasowej [1, 3, 4]. Szczególnie konserwowany obszar, w którym dotychczas nie wykryto żadnej zmienności, to fragment C-końcowy polipeptydu podjednostki- α , który wydaje się odgrywać istotną rolę w ekspresji aktywności biologicznych. W podjednostce- α występuje pięć wewnętrznościowych wiązań dwusiarczkowych. Redukcja wiązania dwusiarczkowego między 11 a 35 resztą cysteinową nie przyczynia się do tworzenia konformacji polipeptydu, która uniemożliwiłaby przyłączenie podjednostki- β . Natomiast redukcja następnego wiązania dwusiarczkowego między 14 a 36 resztą znosi strukturę czwartorzędową glikohormonu [5].

Tkanki, które produkują hormony glikoproteinowe często wydzielają pojedyncze, wolne podjednostki- α [6], które nie agregują z podjednostką- β [7-11].

¹ Dr, ² prof. dr hab. n. med., Katedra i Zakład Biochemii i Chemii, Śląska Akademia Medyczna, 40-752 Katowice, ul. Medyków 18.

Sekwencja aminokwasowa podjednostek- β , wszystkich czterech hormonów pochodzących od ludzi oraz wielu różnych zwierząt, jest już znana [12-21]. Charakterystyczna jest duża homologia sekwencji aminokwasowej β -podjednostek pochodzących z różnych glikohormonów. Zachowana jest niezmiennosc pozycji 12 reszt cysteinowych uczestniczących w tworzeniu wewnątrzłańcuchowych wiązań dwusiarczkowych.

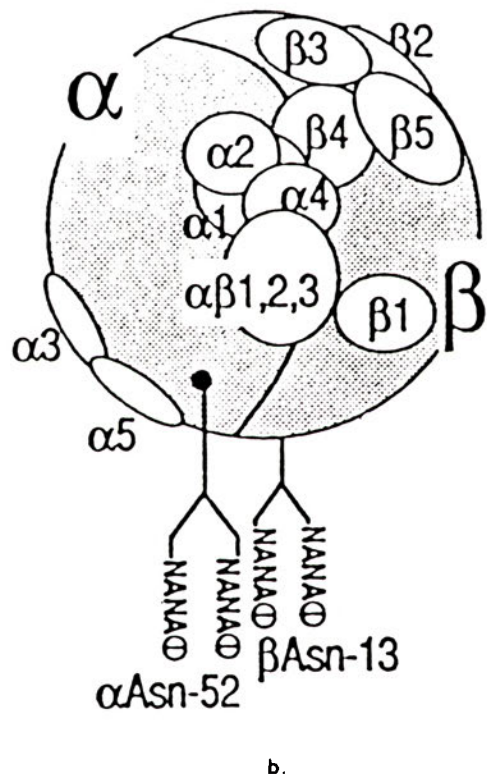
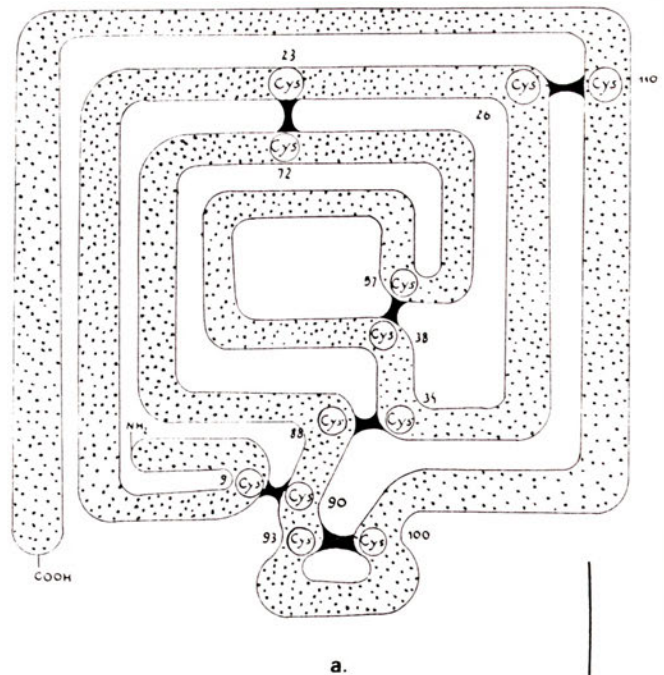
Konformacja przestrzenna heterodimerskiego holohormonu jest globularna (Ryc. 1). Łańcuchy polipeptydowe poszczególnych podjednostek wydają się mieć strukturę znacznie upakowaną, na podobieństwo β -podjednostki hCG przedstawionej na rycinie 1a, stabilizowaną wewnątrzłańcuchowymi wiązaniami kowalencyjnymi -S-S. Na hydrofilnej powierzchni globularnego holohormonu hCG zidentyfikowano 14 różnych epitopów (determinant antygenowych) rozpoznawanych przez monoklonalne przeciwciała (MCA) (Ryc. 1b) [22-28]. Epitopy te tworzone są przez rdzeń białkowy, a nie przez łańcuchy węglowodanowe, ponieważ deglikozylowany holohormon hCG nie jest odróżnialny antygenowo od natywnego hCG przez stosowane przeciwciała monoklonalne.

II-2. Struktura oligosacharydów

Glikohormony zawierają trzy lub cztery łańcuchy oligosacharydowe związane N-glikozydowo poprzez Asn. Choriogonadotropina i folitropina zawierają cztery, po dwa na każdej z α - i β -podjednostek. Lutropina i tyreotropina zawierają trzy N-glikany, po dwa na α -podjednostkach i po jednym na ich β -podjednostkach [3, 4].

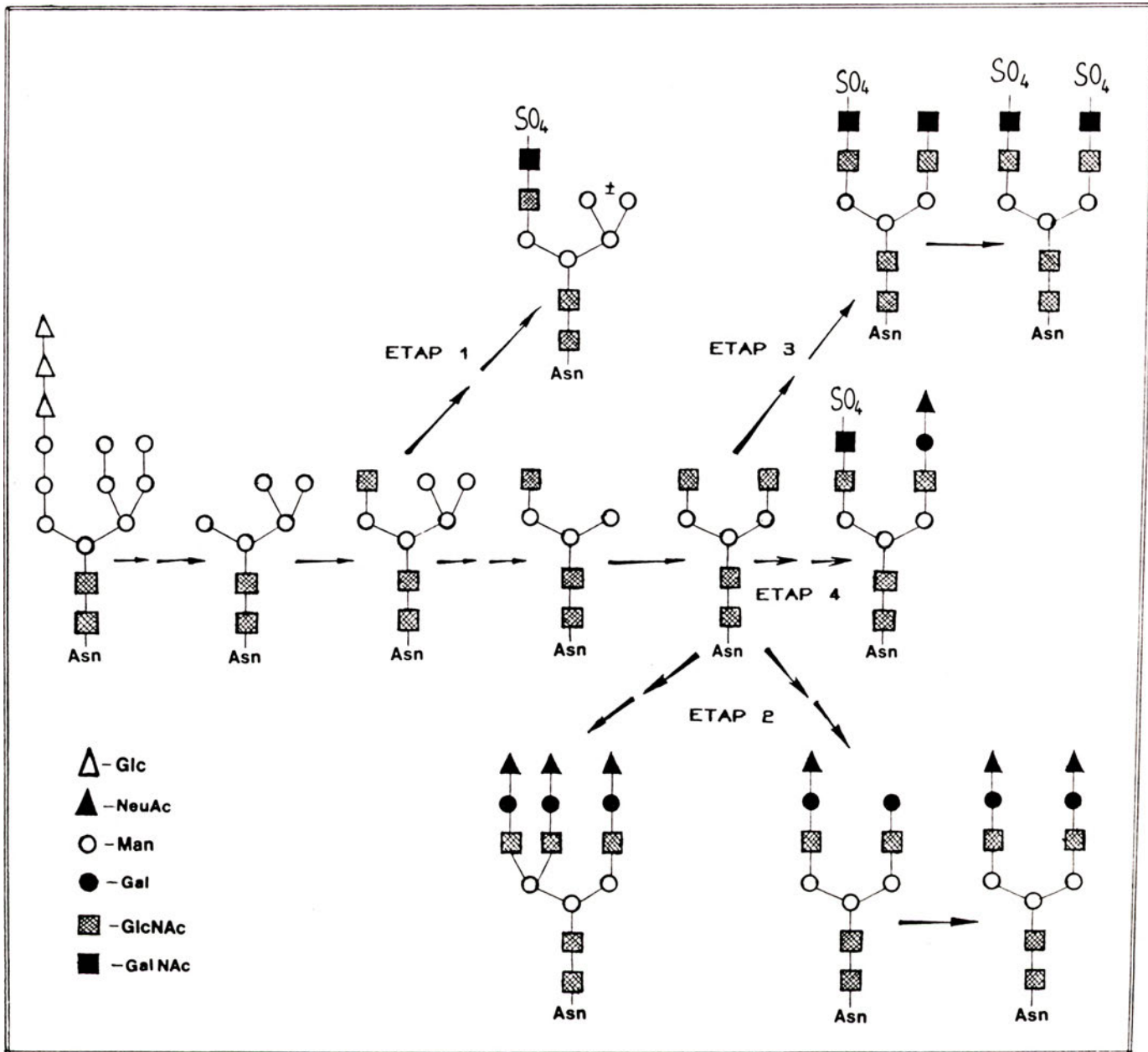
Zróźnicowanie N-glikanów glikohormonów jest znaczne i dotyczy zarówno pojedynczego heterodimeru, wolnych podjednostek, poszczególnych heterodimerów między sobą w obrębie jednego gatunku i między gatunkami [29-37], jak i określonego etapu ontogenezy [38-40]. Ponadto, Green i wsp. [3] sugerują, że każdy przysadkowy hormon glikoproteinowy składa się z szeregu izoform, które różnią się zarówno ładunkiem jak i bioaktywnością. Izofomy te są prawdopodobnie z jednej strony pośrednimi produktami biosyntetycznymi, zwłaszcza terminalizacji glikozylacji na różnych etapach jej obróbki, a z drugiej strony wynikiem różnego stopnia ich siarczanowania i sjałozylacji.

Ogólna struktura N-glikanów występujących w glikohormonach nie odbiega od typowych oligosacharydów tej grupy w zakresie sekwencji rdzeniowej wiążącej jednostkę oligosacharydową z białkiem [41-43]. Zasadnicze natomiast różnice wskazujące na ich odrębność dotyczą łańcuchów zewnętrznych tych oligosacharydów (Ryc. 2). Wyjątkowość części N-glikozydowo związanych oligosacharydów wynika z obecności w ich łańcuchach zewnętrznych reszt, których nie odnajdywano w innych typowych glikoproteinach np. osoczowych. Taką resztą cukrową jest β -D-GalNAc



Ryc. 1. Model β -podjednostki hCG z zaznaczonymi pozycjami wewnątrzłańcuchowych wiązań dwusiarczkowych [a], oraz model globularnego holohormonu hCG z zaznaczonymi epitopami, wykrywalnymi przez przeciwciała monoklonalne (b) [wg 26].

[33], aminocukier, który wcześniej odnajdywany był przede wszystkim jako składnik glikoaminoglikanów proteoglikanów [41]. Reszta β -GalNAc obecna jest w miejscu zwykle zajmowanym przez resztę β -Gal występującą w łańcuchu zewnętrznym typowych N-glikanów. Taka pozycja reszty β -GalNAc w N-wiązanych oligosacharydach nie została wcześniej wykazana w żadnych innych glikoproteinach [29].



Ryc. 3. Model toru biosyntetycznego siarczanowanych i sjałozylowanych N-glikanów hormonów glikoproteinowych [wg 35].

wej, co przypuszczalnie ma miejsce w glikozylacji wolnej α -podjednostki hCG [45]. Wkrótce po przeniesieniu tetradecasacharydu na polipeptyd, podlega on wielu przemianom składającym się na etap obróbki pierwotnego oligosacharydu do jednostek hybrydowych i kompleksowych, którego początkowe fazy mające miejsce w RER przebiegają zgodnie z modelem przyjętym dla innych glikoprotein (Ryc. 3) [2, 35, 41, 42]. Poza inicjacją N-glikozylacji, również w przestrzeni luminalnej RER podczas fałdowania polipeptydu powstają wewnątrzłańcuchowe wiązania dwusiarczkowe. Obecny na powstającym polipeptydzie pierwotny oligosacharyd może ułatwić właściwe fałdowanie polipeptydu i tworzenie odpowiednich mostków dwusiarczkowych [48]. W tym samym czasie następuje odcinanie sekwencji sygnałowej z N-końca polipeptydu przez peptydazę sygnałową oraz rozpoczyna się łączenie α -podjednostek z β -podjednostkami

[3, 49]. Dalsze przemieszczanie glikohormonów z RER do aparatu Golgiego następuje w postaci heterodimeru [2, 3, 49].

W aparacie Golgiego po usunięciu kolejnych α 1-2 związanych Man i przyłączeniu GlcNAc do Man ramienia α -3 sekwencji rdzeniowej (Ryc. 3.) zgodnie z przyjętym modelem syntezy oligosacharydów glikoprotein [41] powstaje oktasacharyd $\text{GlcNAcMan}_5\text{GlcNAc}_2\text{-Asn}$, który może stać się substratem dla wielu enzymów, m.in. dla hormonospecyficznej N-acetylogalaktozaminotransferazy [50]. Pojawienie się reszty GalNAc przy jednostkach $\text{GlcNAcMan}_5\text{GlcNAc}_2\text{-Asn}$ umożliwia dalszą obróbkę tych oligosacharydów przez mannozydazę II aparatu Golgiego z komórek przysadki wołu [34, 35]. Działanie GalNActransferazy na tym etapie obróbki determinuje kierunek syntezy do jednostek hybrydowych, które następnie są siarczanowane (Ryc. 3., etap 1). Dalsza synteza od oktasachary-

du $\text{GlcNAcMan}_5\text{GlcNAc}_2\text{-Asn-}$ do sjałozylowanych oligosacharydów (Ryc. 3., etap 2) np. hCG w komórkach trofoblastu czy FSH w przysadce wydaje się przebiegać typowym torem biosyntetycznym opisanym dla innych glikoprotein [41]. Natomiast etapy syntezy prowadzące do kompleksowych oligosacharydów zawierających grupy siarczanowe (Ryc. 3. etap 3 i 4) w glikohormonach przysadkowych znamienne różnią się od syntezy N-glikanów innych glikoprotein. Zgodnie z zaproponowanym przez Greena i wsp. [35] przebiegiem toru biosyntetycznego jednostek cukrowych przysadkowych glikohormonów (Ryc. 3.) rozwidlenie dróg w kierunku kompleksowych oligosacharydów siarczanowanych zdeterminowane jest działaniem β -GalNAc transferazy, która lokuje GalNAc w pozycji zajmowanej przez Gal w sjałozylowanych łańcuchach zewnętrznych. Hormonospecyficzna GalNAc transferaza do selektywnego transferu reszty GalNAc na oligosacharydowe akceptory glikohormonów wykorzystuje specyficzną trójaminokwasową sekwencję Pro-Xaa-Arg/Lys (Xaa jest dowolnym aminokwasem) oddaloną od N-glikozylowanej Asn o 6-9 reszt aminokwasowych licząc od aminowej strony polipeptydu, która zwana jest „peptydowym markerem rozpoznania” [51]. Te markerowe motywy obecne są na wspólnej α -podjednostce i poszczególnych β -podjednostkach LH, TSH oraz hCG, lecz nie występują na β -podjednostce FSH [51]. Ostatnio wykryto „peptydowy marker rozpoznania” również w innych białkach, jak proopiomelanokortynie [52] oraz osoczym inhibitorze czynnika tkankowego krzepnięcia [53]. Obecność tego markera w obrębie białka ma być gwarantem wykorzystania go jako substratu przez GalNAc transferazę dla wydłużenia jego N-glikanów o resztę GalNAc i następnie jego siarczanowania, natomiast brak markera ma być jednoznaczny z faktem, że oligosacharydy w tym białku nie mogą zawierać reszt GalNAc i w konsekwencji grup siarczanowych. W trakcie biosyntezy prowadzącej do siarczanowanych kompleksowych jednostek (Ryc. 3) kluczowym substratem oligosacharydowym dla GalNAc transferazy jest $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2\text{-Asn}$ [35, 50]. Przyłączenie β -GalNAc nadaje tworzonemu oligosacharydowi swoistą strukturę, która jest wystarczająca do rozpoznania przez przysadkową sulfotransferazę [3, 34, 35, 50]. W przeciwieństwie do przysadki w łożysku nie wykryto oznaczalnych aktywności GalNAc transferaz ani sulfotransferaz [30, 33, 34, 51]. Udowodniono jednak, że choriogonadotropina może być dobrym substratem dla tych enzymów pochodzących z innych źródeł, np. z przysadki. Wynikać to ma z obecności „peptydowego markera rozpoznania” dla GalNAc transferazy w obrębie struktury I rządowej tego glikohormonu. Koncepcja zakładająca [51], że obecność w komórkach hormonospecyficznej GalNAc transferazy oraz kompetentnego dla niej substratu z „peptydowym markerem rozpoznania” jest wystarczającym warunkiem dla zaistnienia przeniesie-

nia reszty GalNAc oraz następczego jej siarczanowania, wydaje się być nadal niezadawalającą dla wyjaśnienia mechanizmu prowadzącego do syntezy jednostek jednocześnie siarczanowanych jak i sjałozylowanych (Ryc. 3, etap 4). Wydaje się że w procesie tym może mieć znaczenie również specyficzność Gal transferazy, której współdziałanie z hormonospecyficzną GalNAc transferazą może gwarantować wytworzenie wspólnego substratu, zarówno dla sulfotransferazy jak i sjałozylotransferazy. Aktualnie nie jest jeszcze znany mechanizm skierowywujący tor biosyntetyczny N-glikanów w kierunku jednostek z grupami siarczanowymi i jednocześnie resztami kwasów sjałowych [Ryc. 3. etap 4].

Obecność na tych samych jednostkach oligosacharydowych jednocześnie terminalnych sekwencji SO_4 -GalNAc- oraz NeuAc-Gal- (np. w hLH) wskazuje, że siarczanowane struktury nie powstają jedynie skutkiem segregacji białka do odrębnych przedziałów aparatu Golgiego przeznaczonych do syntezy siarczanowanych oligosacharydów. Przedziałowe rozmieszczenie enzymów uczestniczących w obróbce oligosacharydów w regionach cis, środkowym i trans aparatu Golgiego ma miejsce [41, 42] i może wspierać pogląd o przestrzennym rozdzieleniu kolejnych reakcji obróbki innych glikoprotein, lecz nie hormonów przysadkowych, gdzie mechanizmy kontrolujące wydają się bardziej złożone.

IV. Funkcja oligosacharydów hormonów glikoproteinowych

Oligosacharydy obecne na glikohormonach mogą przyczyniać się do utrzymywania ich wewnątrzkomórkowej stabilności [48, 54], swoistej agregacji do heterodimeru i sekrecji z komórki [55-59]. Jednocześnie mogą modulować okres biologicznego półtrwania w osoczu oraz mogą być odpowiedzialne za prawidłowe oddziaływanie z receptorem komórek docelowych i transdukcję sygnału hormonalnego.

IV-1. Rola oligosacharydów w wiązaniu glikohormonów z docelowymi receptorami oraz w transdukcji sygnału

Hormony glikoproteinowe działają na komórkę docelową przez receptory sprzężone z cyklazą adenylatową, która w wypadku gonadotropin przyczynia się do wzrostu m.in. steroidogenezy w komórkach docelowych [62, 63]. Receptory dla glikohormonów [64-66] zaliczane są do nowej klasy w obrębie nadrodziny receptorów sprzężonych z białkami G, spośród których wyróżniają się obecnością dużej pozakomórkowej domeny stanowiącej N-końcowy fragment polipeptydu [67, 68]. Obie α - jak i β -podjednostki holohormonu uczestniczą w wiązaniu z receptorem [69].

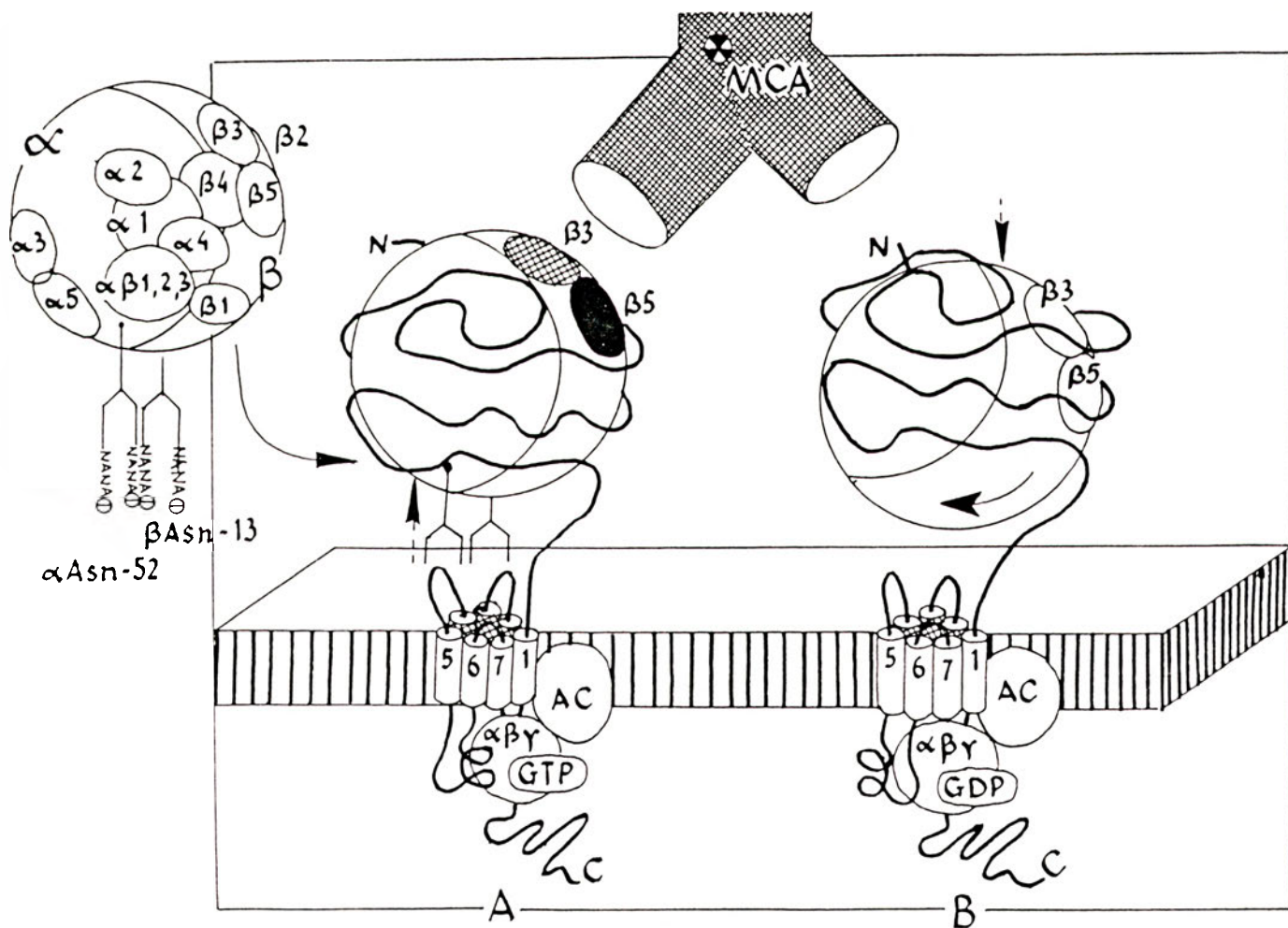
Usunięcie terminalnych reszt kwasów sjałowych np. z hCG zwiększa powinowactwo hormonu do wiązania

się z receptorem na powierzchni komórek docelowych, natomiast obniża jego zdolność do stymulacji syntezy cAMP. Ekspresja aktywności hormonalnej wydaje się być zależna od ujemnych ładunków niesionych przez cząsteczki kwasów sjałowych. Udokumentowano już, że w transdukcji sygnału biologicznego uczestniczą określone pod względem pozycji oligosacharydy, a nie wszystkie występujące w obrębie holohormonu [55-57, 70].

Schwarz i wsp. zaproponowali model wyjaśniający interakcję hCG z receptorem (Ryc. 4), uwzględniający zachowywanie się tej gonadotropiny, tak jak typowy agonista lub kompetencyjny antagonist [26, 28]. Oddziaływanie glikohormonu z N-terminalną pozakomórkową domeną receptora-CG ma charakter „wielofasadowego” kontaktu typu białko-białko (*a multifaceted protein-protein contact*) (Ryc. 4), w którym zaangażowana jest większość epitopów wolnej powierzchni hCG. Interakcja ta umożliwia przyjęcie przez hCG ostatecznej konformacji wymaganej dla pełnej aktywności holohormonu jako agonisty (Ryc. 4a). Konformacja przestrzenna hCG jako agonisty, którą można stwierdzić tylko w stanie związanym

z receptorem sprawia, że większość z 14 epitopów staje się niedostępna dla przeciwciał monoklonalnych, z wyjątkiem dwóch, tj. epitopów $\beta 3$ i $\beta 5$ (Ryc. 4a). Obecność dwóch ważnych N-glikanów α Asn-52 i β Asn-13, wydaje się determinować ten agonistyczny typ oddziaływania hCG z receptorem, skoro usunięcie ich zmienia charakter oddziaływania glikohormonu z receptorem. Deglikozylowana hCG silniej oddziałuje z receptorem i jednocześnie zachowuje się jak kompetencyjny antagonist w transdukcji sygnału (Ryc. 4b). Podczas antagonistycznej interakcji deglikozylowana hCG przybiera orientację przestrzenną, która uniemożliwia wykrycie jakiegokolwiek epitopu na jej powierzchni przez stosowane wcześniej przeciwciała monoklonalne (Ryc. 4b). Ta odmienna orientacja hCG wynikająca z nieobecności węglowodanów jest stanem „nieproduktywnym”, odzwierciedla niekompetentny w transdukcji sygnału, sposób związania tego glikohormonu z receptorem.

Mikroheterogenność oligosacharydów w różnych izoformach tego samego holohormonu narzuca odrębny, indywidualny ładunek poszczególnym cząsteczkom.



Ryc. 4. Model przedstawiający interakcję glikohormonu z docelowym receptorem LH, CG, zarówno jako agonisty hCG (A), jak i kompetencyjnego antagonisty degli-hCG (B) [wg 26].

Z lewej strony schematu widoczna jest wolna, niezwiązana makrocząsteczka hCG z wykrywalnymi wszystkimi epitopami; epitopy, które nie są widoczne znajdują się po drugiej stronie makrocząsteczki. Przedstawiono jedynie N-glikany mające istotne znaczenie w transdukcji sygnału hormonalnego. Epitopy $\beta 3$ i $\beta 5$ zaznaczono na ciemno, kiedy są wykrywalne przez MCA na hCG związanym z receptorem (A), lub na jasno, gdy nie są wykrywalne przez MCA na degli-hCG związanym z receptorem (B). Stan: A — produktywny, dochodzi do transdukcji sygnału hormonalnego; stan: B — nieproduktywny, brak transdukcji sygnału hormonalnego.

co może modulować ustaloną potencję (siłę) hormonalną [3, 61, 71]. Tym samym, oligosacharydy obecne na hormonach glikoproteinowych, mogą modulować siłę biologiczną hormonu poprzez swą mikroheterogenność, a w konsekwencji wpływać na stan endokrynowy zwierzęcia. Krańcowymi fazami modulacji potencji hormonu wydaje się być stan agonistyczny, bądź antagonistyczny hormonu przedstawiony na rycinie 4.

IV-2. Rola oligosacharydów w metabolicznym obrocie (*turnover*) glikohormonów

Heterogenność glikozylacyjna oligosacharydów może leżeć u podstaw istnienia zarówno mniej jak i bardziej trwałych form glikoprotein. Sugeruje się, że ostateczny okres półtrwania określonych glikohormonów w krążeniu jest zdeterminowany ich interakcją z różnorodnymi receptorami lektynowymi.

W 1991 roku wykryto [72] na powierzchni komórek endotelialnych i komórek Kupffera wątroby obecność receptora specyficznie rozpoznającego terminalne sekwencje $SO_4-4GalNAc\beta 1.4GlcNAc\beta 1.2Man\alpha-$ (S4GGnM) w obrębie oligosacharydów glikohormonów. Receptor ten szczególnie licznie prezentowany jest na komórkach endotelialnych wątroby. Funkcjonowanie receptora na nieparenchymalnych komórkach wątroby może tłumaczyć szybkie usuwanie z krążenia glikohormonów posiadających unikalne terminalne sekwencje oligosacharydowe S4GGnM, np. LH. Swoistość receptora odróżnia go od innych znanych dotychczas receptorów uczestniczących w usuwaniu glikoprotein z krążenia, która w tym wypadku ukierunkowana jest na ligand w pełni wyeksponowany na natywnej glikoproteinie, a nie na ligand będący produktem częściowej degradacji, jak to ma miejsce w wypadku innych lektynowych receptorów zaangażowanych w katabolizm glikoprotein [41]. Obecność specyficznego receptora dla siarczanowanych glikohormonów prowadzi do gwałtownego ich wychwytu, internalizacji w komórkach endotelialnych wątroby i w efekcie do krótkiego okresu półtrwania w krążeniu. Wykazano, że po dożylniej iniekcji natywnego bLH lub eLH większość hormonu jest usuwana z krążenia w początkowej szybkiej fazie za pośrednictwem S4GGnM-specyficznego receptora, a okres biologicznego półtrwania dla natywnej bLH ma wynosić 1.2 min [73, 74]. Większość hCG lub eCG jest usuwana z krążenia głównie w wolnej fazie bez uczestnictwa S4GGnM-specyficznego receptora klirensowego, lecz za pośrednictwem innych receptorów lektynowych [41], a okres biologicznego półtrwania w krążeniu dla natywnej hCG wynosi 119 min [73, 74]. Natomiast eLH usuwany jest z krążenia około 6 razy szybciej niż eCG i klirens ten zlokalizowany jest głównie w obrębie wątroby. Skoro zasadnicze strukturalne różnice między tymi dwoma glikohormonami dotyczą terminalnych sekwencji N-glikozydowo związanych oligosacharydów to one właśnie,

dzięki istnieniu receptora klirensowego, leżą u podstaw odmiennego ich okresu półtrwania w krążeniu, jak i biologicznych różnic między eCG i eLH [74].

Choriogonadotropina uwalniana jest z trofoblastu konstytucyjnie co w połączeniu z przedłużonym okresem jej półtrwania w krążeniu prowadzi do podwyższonego poziomu we krwi, który nie zmienia się zmiennie w ciągu 24 godz. Przeciwnie LH, ta gonadotropina jest magazynowana w ziarnistościach sekrecyjnych i wydzielana pulsacyjnie pod wpływem stymulacji, po czym szybko usuwana z krążenia przy aktywnym udziale S4GGnM-specyficznego receptora klirensowego. Krótki okres półtrwania lutropiny w krążeniu w połączeniu z nieciągłą sekrecją wydają się być podstawowymi czynnikami gwarantującymi pulsacyjną stymulację receptora docelowego, i przejawianie specyficznego funkcji biologicznej przez LH.

Hipotez wyjaśniających rolę jaką mogą spełniać oligosacharydy obecne w glikoproteinach jest wiele, przedstawione są we wcześniejszym opracowaniu [41].

W glikohormonach rola N-glikanów ma znaczenie w funkcji pełnionej przez te glikoproteiny, nie tylko przez zabezpieczenie agonistycznego lub antagonistycznego sposobu oddziaływania z receptorem, ale również poprzez determinowanie specyficznego okresu półtrwania danego glikohormonu w krążeniu. To ostatnie wydaje się być podstawą różnic biologicznych między LH i CG. Ostatnio zaproponowana koncepcja przez D r i c k a m e r a [75] starającą się wyjaśnić nadrzędny cel glikozylacji białek powstała m.in. na bazie danych dotyczących glikohormonów i ich receptorów klirensowych. Zgodnie z tą koncepcją głównym celem glikozylacji ma być zakodowanie informacji o pożądanym okresie półtrwania nie tylko glikohormonów lecz wszystkich białek w organizmie. Kod ten może dotyczyć glikoprotein niezależnie od ich ostatecznych, specyficznym funkcji pełnionych w organizmie. Kod oligosacharydowy porównywany jest przez twórcę koncepcji z kodem paskowym obecnym na różnorodnych artykułach konsumpcyjnych, z tym, że odpowiednikiem zakodowanych w paskach cen, ma być zakodowana w jednostkach oligosacharydowych informacja o czasie półtrwania glikoprotein.

*Artykuł otrzymano 25 października 1993 r.
Zaakceptowano do druku 10 marca 1994 r.*

Piśmiennictwo

1. Pierce JG, Parsons TF (1981) *Annu Rev Biochem* 50: 465-495
2. Kobata A (1992) *Eur J Biochem* 209: 483-501
3. Green ED, Boime I, Baenziger JU (1986) *Moll Cell Biochem* 72: 1-100
4. Stockell Hartree A, Renwick AGC (1992) *Biochem J* 287: 665-679
5. Mise T, Bahl OP (1980) *J Biol Chem* 255: 8516-8522
6. Chen R, Barnea E, Benveniste R (1986) *Hormone Res* 23: 38-49
7. Parsons TF, Bloomfield GA, Pierce JG (1983) *J Biol Chem* 258: 240-244

8. Nishimura R, Hamamoto T, Utsunomiya T, Mochizuki M (1983) *Endocrinol Japan* **30**: 663-669
9. Blithe DL, Nisula BC (1985) *Endocrinology* **117**: 2218-2228
10. Corless CL, Bielińska M, Ramabhadran TV, Daniels-McQueen S, Otani T, Reitz BA, Tiemeier DC, Boime I (1987) *J Biol Chem* **262**: 14197-14203
11. Stannard BS, Gesundheit N, Ronin C, Burnside J, Weintraub BD (1988) *J Biol Chem* **263**: 8309-8317
12. Hayashi H, Hayashi T, Hanaoka Y (1992) *Eur J Biochem* **203**: 185-191
13. Liu CS, Huang FL, Chang YS, Lo TB (1989) *Eur J Biochem* **186**: 105-114
14. Virgin JB, Silver BJ, Thomason AR, Nilson JH (1985) *J Biol Chem* **260**: 7072-7077
15. Chin W W, Godine JE, Klein DR, Chang AS, Tan L K, Habener JF (1983) *Proc Natl Acad Sci USA* **80**: 4649-4653
16. Biousfield GR, Liu WK, Sugino H, Ward DN (1987) *J Biol Chem* **262**: 8610-8620
17. Sugino H, Bousfield GR, Moore WT, Ward DN (1987) *J Biol Chem* **262**: 8603-8609
18. Maurer RA, Croyle ML, Donelson JE (1984) *J Biol Chem* **259**: 5024-5027
19. Chin W W, Muccini JA, Shin L (1985) *Biochem Biophys Res Commun* **128**: 1152-1158
20. Wolf O, Kourides IA, Gurr JA (1987) *J Biol Chem* **262**: 16596-16603
21. Wondisford FE, Radovick S, Moates JM, Usala SJ, Weintraub BD (1988) *J Biol Chem* **263**: 12538-12542
22. Schwarz S, Berger P, Wick G (1985) *Clin Chem* **31**: 1322-1328
23. Schwarz S, Berger P, Wick G (1986) *Endocrinology* **118**: 189-197
24. Schwarz S, Berger P, Nelboeck E, Kashabi D, Panmoung W, Klieber R, Wick G (1988) *J Receptor Res* **8**: 437-453
25. Berger P, Klieber R, Panmoung W, Madersbacher S, Wolf H, Wick G (1990) *J Endocrinology* **125**: 301-309
26. Schwarz S, Krude H, Merz WE, Lottersberger C, Wick G, Berger P (1991) *Biochem Biophys Res Commun* **178**: 699-706
27. Schwarz S, Krude H, Klieber R, Dirnhofner S, Lottersberger C, Merz WE, Wick G, Berger P (1991) *Moll Cell Endocrin* **80**: 33-40
28. Schwarz S, Krude H, Wick G, Berger P (1991) *Mol Cell Endocrin* **82**: 71-79
29. Green ED, Van Halbeek H, Boime I, Baenziger JU (1985) *J Biol Chem* **260**: 15623-15630
30. Green ED, Baenziger JU, Boime I (1985) *J Biol Chem* **260**: 15631-15638
31. Green ED, Baenziger JU (1988) *J Biol Chem* **263**: 25-35
32. Green ED, Baenziger JU (1988) *J Biol Chem* **263**: 36-44
33. Green ED, Gruenebaum J, Bielińska M, Baenziger JU, Boime I (1984) *Proc Natl Acad Sci USA* **81**: 5320-5324
34. Green ED, Morishima C, Boime I, Baenziger JU (1985) *Proc Natl Acad Sci USA* **82**: 7850-7854
35. Green ED, Boime I, Baenziger JU (1986) *J Biol Chem* **261**: 16309-16316
36. Weisshaar G, Hiyama J, Renvick AGC, Nimtz M (1991) *Eur J Biochem* **195**: 257-268
37. Weisshaar G, Hiyama J, Renvick AGC (1991) *Glycobiology* **1**: 393-404
38. Gyves PW, Gesundheit N, Stannard BS, Weintraub BD (1989) *J Biol Chem* **264**: 6104-6110
39. Gyves PW, Gesundheit N, Taylor T, Butler JB, Weintraub BD (1987) *Endocrinology* **121**: 133-140
40. Gesundheit N, Magner JA, Chen T, Weintraub BD (1986) *Endocrinology* **119**: 455-463
41. Żak I (1990) Glikoproteiny ssaków. Monografia Biochemiczna 35, PWN, Warszawa
42. Palamarczyk G (1987) *Post Biochem* **33**: 297-307
43. Noworytko J, Guzdek A (1987) *Post Biochem* **33**: 65-80
44. Bedi GS, French WC, Bahl OP (1982) *J Biol Chem* **257**: 4345-4355
45. Kawano T, Endo T, Nishimura R, Mizuochi T, Michizuki M, Kichibe N, Kobata A (1988) *Arch Biochem Biophys* **267**: 787-796
46. Cole LA, Birken S, Perini F (1985) *Biochem Biophys Res Commun* **126**: 333-339
47. Damm JBL, Hard KK, Kamerling JP, Van Demdem G W K, Vliegenthart JFG (1990) *Eur J Biochem* **189**: 175-183
48. Beebe JS, Mountjoy K, Krzesicki RF, Perini F, Ruddon RW (1990) *J Biol Chem* **265**: 312-317
49. Magner JA (1990) *Endocrin Rev* **11**: 354-385
50. Smith PL, Baenziger JU (1988) *Science* **242**: 930-933
51. Smith PL, Baenziger JU (1992) *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 329-333
52. Skelton TP, Kumar S, Smith PL, Beranek MC, Baenziger JU (1992) *J Biol Chem* **267**: 12998-13006
53. Smith PL, Skelton TP, Fiete D, Dharmesh SM, Beranek MC, Mac-Phail L, Broze GJ, Baenziger JU (1992) *J Biol Chem* **267**: 19140-19146
54. Ruddon RW, Krzesicki RF, Norton SE, Beebe JS, Peters BP, Perini F (1987) *J Biol Chem* **262**: 12533-12540
55. Matzuk MM, Boime I (1988) *J Biol Chem* **263**: 17106-17111
56. Matzuk MM, Boime I (1988) *J Cell Biol* **106**: 1049-1059
57. Matzuk MM, Kornmeier CM, Whitfield G, Kourides I, Boime I (1988) *Mol Endocrinol* **2**: 95-100
58. Strickland TW, Thomason AR, Nilson JH, Pierce JG (1985) *J Cell Biochem* **29**: 225-237
59. Strickland TW, Pierce JG (1985) *J Biol Chem* **260**: 5816-5819
60. Corless CL, Matzuk MM, Ramabhadran TV, Krichevsky A, Boime I (1987) *J Cell Biol* **104**: 1173-1181
61. Baenziger JU, Green ED (1988) *Biochim Biophys Acta* **947**: 287-306
62. Ascoli M, Pignataro OP, Segaloff DL (1989) *J Biol Chem* **264**: 6674-6681
63. Pereira ME, Segaloff DL, Ascoli M, Eckstein F (1987) *J Biol Chem* **262**: 6093-6100
64. McFarland KC, Sprengel R, Phillips HS, Kohler M, Roseblit N, Nickolics K, Segaloff DL, Seeburg PH (1989) *Science* **245**: 494-499
65. Parmentier M, Libert F, Maenhaut C, Lefort A, Gerard C, Perret J, Van Sande J, Dumont JE, Vassart G (1989) *Science* **246**: 1620-1622
66. Sprengel R, Braun T, Nickolics K, Segaloff DL, Seeburg PM (1990) *Mol Endocrinol* **4**: 525-530
67. Rodriguez MC, Segaloff DL (1990) *Endocrinology* **127**: 674-681
68. Xie Y B, Wang H, Segaloff DL (1990) *J Biol Chem* **265**: 21411-21414
69. Ryan RJ, Keutmann HT, Charlesworth MC, McCormick DJ, Milius RP, Calvo FO, Vutyavanich T (1987) *Rec Progr Horm Res* **43**: 383-429
70. Matzuk MM, Keene JL, Boime I (1989) *J Biol Chem* **264**: 2409-2414
71. Smith PL, Kaetzel D, Nilson J, Baenziger JU (1990) *J Biol Chem* **265**: 874-881
72. Fiete D, Srivastava V, Hindsgaul O, Baenziger JU (1991) *Cell* **67**: 1103-1110
73. Baenziger JU, Kumar S, Brodbeck RM, Smith PL, Beranek MC (1992) *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 334-338
74. Smith PL, Bousfield GR, Kumar S, Fiete D, Baenziger JU (1993) *J Biol Chem* **268**: 795-802
75. Drickamer K (1991) *Cell* **67**: 1029-1032

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

Udział białek w procesie aklimatyzacji roślin do niskiej temperatury

Cold-regulated proteins in cold acclimated plants

DANUTA SOLECKA*

Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Białka syntetyzowane pod wpływem niskiej temperatury (białka COR)
 - II-1. Występowanie białek COR u roślin
 - II-2. Białka COR u *Arabidopsis thaliana*
- III. Regulacja syntezy białek COR
 - III-1. Identyfikacja genów *cor*
 - III-2. Regulacja ekspresji genów *cor*
 - III-3. Wpływ ABA na syntezę białek COR
 - III-4. Inne czynniki regulujące syntezę białek COR
- IV. Rola białek COR
- V. Podsumowanie

Contents:

- I. Introduction
- II. COR proteins
 - II-1. Distribution of COR proteins in plants
 - II-1. COR proteins in *Arabidopsis thaliana*
- III. Regulation of synthesis COR proteins
 - III-1. Identification of *cor* genes
 - III-2. Regulation of expression *cor* genes
 - III-3. The effect of ABA on COR proteins synthesis
 - III-4. Other factors involved in regulation of synthesis of COR proteins
- IV. Possible role of COR proteins
- V. Concluding remarks

Wykaz stosowanych skrótów: CAP — białka pojawiające się podczas aklimatyzacji roślin do niskiej temperatury (*cold acclimation protein*); CAS — specyficzne białka pojawiające się podczas aklimatyzacji roślin do niskiej temperatury (*cold acclimation specific protein*); COR — białka, których synteza jest regulowana przez niską temperaturę (*cold-regulated protein*); LTI — białka, których synteza jest indukowana podczas aklimatyzacji roślin do niskiej temperatury (*low temperature induced protein*); *cor* — geny, których ekspresja jest regulowana przez niską temperaturę (*cold regulated gene*); *cas* — geny, których ekspresja jest regulowana przez niską temperaturę (*cold acclimation specific gene*); *lti* — geny, których ekspresja jest indukowana przez niską temperaturę (*low temperature induced gene*); RAB — białka, których synteza jest regulowana przez ABA (*responsive to-ABA protein*); *rab* — geny, których ekspresja jest regulowana przez ABA (*responsive to-ABA gene*); AFP — białka z arktycznych ryb zapobiegające zamrażaniu osocza krwi (*antifreeze protein*); INP — białka wywołujące krystalizację lodu (*ice nucleation protein*); LEA — białka nagromadzające się w nasionach w późnym okresie embriogenezy (*late embryogenesis abundant protein*); HSC — białka szoku cieplnego (*heat shock cognate protein*); ABA — kwas abscysynowy; RUBPC — karboksylaza rybulozo-bis-fosforanu; G6P — glukoza-6-fosforan; PEP — fosfoenolpirogronian.

I. Wstęp

W komórkach roślin chłodoodpornych poddanych działaniu niskiej temperatury zachodzą zmiany, które z jednej strony umożliwiają dostosowanie tkanek do

funkcjonowania w warunkach chłodu, a z drugiej strony — prowadzą do przebudowy struktur komórkowych, co umożliwia roślinom przetrwanie bez uszkodzeń stresu mrozowego [1-3]. Obserwacje te, w świetle wyników badań fizjologicznych i genetycznych sugerują, że proces aklimatyzacji jest związany z aktywacją pewnych genów, a więc z syntezą białek, których właściwości umożliwiają zachodzenie procesów aklimatyzacyjnych.

Badania na temat roli białek w procesie aklimatyzacji roślin trwają od lat 50-tych. Pierwsze obserwacje pochodzą z prac Siminoviticha, który opisał akumulację białek i innych składników (fosfolipidów, kwasów nukleinowych) w komórkach parenchymatycznych pędów topoli w okresie jesieni [4]. Zjawisko to obserwowano zarówno u roślin drzewiastych jak i zielnych, poszukując korelacji między poziomem białka a mrozoodpornością tkanki. Przegląd tych prac przedstawiono w artykułach Siminoviticha [5] i Guy'a [6]. Obserwowano również zmiany jakościowe związane z pojawianiem się lub zanikaniem pewnych frakcji białek podczas procesu hartowania [7-10]. Stwierdzono, że w trakcie aklimatyzacji zachodzi m.in. synteza izozymów o zmienionych właściwościach. Zmiany te dotyczą wielkości cząsteczki białka, jego stabilności, właściwości kinetycznych. Zjawisko to opisano m.in. dla RUBPC, reduktazy glutationu, dehydrogenazy G6P, karboksylazy PEP, kinazy pirogronianowej, inwertazy, fosfataz, peroksydaz, ATP-az [6].

Na początku lat 70-tych wykazano, że zmianom poziomu białka podczas hartowania roślin towarzyszą zmiany poziomu RNA [5]. Pierwszym badaczem, który sugerował, że proces aklimatyzacji roślin do

* Mgr, Zakład Fizjologii Odporności Roślin, Instytut Biologii Eksperymentalnej Roślin, Uniwersytet Warszawski ul. Krakowskie Przedmieście 26/28 00-927 Warszawa

niskiej temperatury może zależeć od modyfikacji ekspresji genów był Weiser [11]. Następne lata przyniosły wiele danych potwierdzających tę hipotezę. Informacje te przedstawiono w artykułach przeglądowych Guy'a [6] i Lee [12].

Białka pojawiające się w komórkach roślin w warunkach działania niskiej temperatury określano w różnych pracach jako CAP [13], CAS [14], COR [15] lub LTI [16], podkreślając rolę niskiej temperatury w regulacji ich syntezy. W obecnej pracy przyjęto określenie „białka COR” jako ogólną nazwę wszystkich białek, których synteza jest regulowana przez niską temperaturę.

II. Białka COR

II-1. Występowanie białek COR u roślin

W związku z wprowadzaniem technik biologii molekularnej do badań dotyczących mechanizmów aklimatyzacji u roślin, w II połowie lat 80-tych pojawiło się wiele prac informujących o wykryciu białek lub polipeptydów, których synteza była wywoływana lub wzmacniana działaniem niskiej temperatury.

I tak, między innymi, wykazano, że w cytosolu komórek liści rzepaku *Brassica napus v. oleifera cv. Górczański* pojawiały się podczas hartowania dwie frakcje drobnocząsteczkowych zasadowych białek o małej zawartości proliny i metioniny [7]. W siewkach rzepaku odmiany *Jet Neuf* stwierdzono syntezę 14 białek oraz zahamowanie syntezy 6 innych podczas 48 godzin działania niskiej (+2°C) temperatury [17].

W hodowli komórkowej stokłosa (*Bromus inermis cv. Manchar*) wzrost mrozoodporności komórek (wyrażanej jako temperatura powodująca 50% uszkodzeń) z -7 do -17°C, obserwowany po 5 dniach inkubacji w temperaturze +2°, był skorelowany z syntezą 7 nowych i represją syntezy 5 innych białek [18, 19].

U psianki (*Solanum commersonii*) wykazano, że podanie cykloheksimidu do hodowli komórkowej hamuje nabywanie mrozoodporności przez komórki [20]. Niska temperatura powodowała syntezę 11-14 nowych polipeptydów, które zanikały już po 1 dniu deaklimatyzacji w +20°C. Niektóre spośród indukowanych przez niską temperaturę polipeptydów występowały tylko w początkowych etapach hartowania. Wydaje się, że przejściowa synteza tych peptydów może być związana z ich rolą regulatorową w procesie nabywania maksymalnej tolerancji na zamarzanie [21, 22].

Porównując obraz elektroforetyczny białek z siewek pszenicy (*Triticum aestivum*) odmiany ozimej i jarej, różniących się odpornością na mróz, stwierdzono, że większość białek indukowanych przez niską temperaturę pojawia się u obu typów roślin. Jediną różnicę stanowiło pojawianie się pod wpływem obniżonej temperatury białka o masie 200 kDa u bardziej odpornej odmiany ozimej [23]. Ten fakt sugeruje, że większość zmian wywołanych w komórkach roślin

przez niską temperaturę nie jest związana z tolerancją zamarzania wody w tkance, ale z dostosowaniem metabolizmu roślin do niskiej temperatury otoczenia [23]. Analiza elektroforetyczna białek z liści, węzłów krzewienia i korzeni pszenicy wykazała, że białko 200 kDa występuje we wszystkich tkankach, ale nagromadza się w dużo większej ilości w tkankach nadziemnych [24]. Ponieważ tkanki te mają znacznie wyższą mrozoodporność niż korzenie, sugerowano, że wyższy poziom syntezy tego białka jest ściśle związany z wyższą mrozoodpornością [24].

Podsumowanie danych na temat zmian składu białek w wyniku aklimatyzacji roślin do niskiej temperatury przedstawiono w tabeli 1.

II-2. Białka COR u *Arabidopsis thaliana*

Najpełniejsze dane na temat białek COR otrzymano dla rzodkiewnika pospolitego (*Arabidopsis thaliana (L.) Heynh*) [15, 16, 26, 27, 38-45]. W 1988 r. wykazano, że u roślin *A. thaliana* poddanych 24-godzinnej aklimatyzacji w temperaturze +4°C, pojawiało się kilka nowych białek [38]. Białka te były hydrofilne i pozostawały rozpuszczone w roztworze wodnym po jego zagotowaniu [38].

Analiza mRNA wykazała, że transkrypcja genów *cor* wzrastała znacząco po 1-4 godzinach hartowania w temperaturze +4°C, osiągała maksimum po 8-12 godzinach i pozostawała na tym poziomie przez cały czas działania niskiej temperatury [38]. Powrót do temperatury +22°C powodował po 4-8 godzinach zahamowanie transkrypcji do poziomu charakterystycznego dla roślin niehartowanych [38].

Określono sekwencje aminokwasowe białek COR [42, 44]. We wszystkich tych białkach stwierdzono duży udział aminokwasów polarnych. Białko o masie 47 kDa (COR47), zawiera 20% kwasu glutaminowego i 14% lizyny, polipeptyd o masie 6.6 kDa (COR6.6) zawiera 24% alaniny, 14% lizyny i 11% glicyny, a białko o masie 15 kDa (COR15) — 18% alaniny, 14% glicyny oraz 24% seryny i treoniny. We wszystkich białkach COR brak było cysteiny i tryptofanu.

W białku COR47 istnieje obszar bogaty w serynę i trzy obszary bogate w lizynę [42]. Fragmenty takie można znaleźć w białkach należących do Grupy II LEA [46].

Białko COR6.6 wykazuje duże podobieństwo do białka KIN1, opisanego wcześniej u *Arabidopsis thaliana* przez Kurkele i Franck [39]. Różnica dotyczy tylko 5 aminokwasów. Oba te białka są podobne do małych białek AFP, występujących u arktycznych ryb [47]. Porównując sekwencję aminokwasową COR6.6 odczytaną z cDNA z sekwencją białek AFP stwierdzono, że 69% reszt aminokwasowych jest identycznych lub podobnych pod względem właściwości biochemicznych [39]. Poza tym COR6.6 i białka AFP mają podobną masę cząsteczek i są bogate w aminokwasy polarne [39].

Tabela 1.

Zmiany zawartości niektórych białek pod wpływem niskiej temperatury

Gatunek	Tempera- tura ekspozycji	Białka [kDa]			Lit.
		wykazujące <i>in vivo</i>		synteza <i>in vitro</i>	
		wzrost zawartości	spadek zawartości		
<i>Agrostemma githago</i>	4°C	78,28	—	—	25
<i>Arabidopsis thaliana</i>	4°C	160, 47	29, 22	160, 47, 24, 15	26
	4°C	150, 80, 69, 60, 45, 30, 24	16	150, 45, 24	27
<i>Bromus inermis</i>	3°C	200, 190, 165, 115, 54, 48, 47, 38, 31, 25	74, 27, 23, 22	—	19, 28
<i>Brassica napus</i>	0°C	17 pasm między 80 a 14	11 pasm między 50 a 14	9 pasm między 80-14	17
	4°C	20, 17	—	20, 17	29
	5°C	2 pasma o R _f 49-52	—	—	7
<i>Citrus sinensis</i>	5°C	160, 6 pasm między 40-16	8 pasm między 65-16	—	30
<i>Medicago falcata</i>	4°C	90, 43, 38, 27, 23, 22, 18, 16, 14, 13	—	90, 86, 72, 48, 38, 36, 33	31
<i>Medicago sativa</i>	4°C	180, 145, 135, 90, 80, 76, 70, 53	—	90, 60, 33, 27, 16	31, 32
<i>Oryza sativa</i>	6°C	95, 75, 25, 21	200, 50, 42, 39, 26, 14, 10	—	33
	7°C	117, 22, 19, 17, 14	—	—	25
<i>Solanum commersonii</i>	4°C	39 pasm między 79-12	14 pasm między 42-13	—	21, 22
<i>Spinacia oleracea</i>	5°C	13 pasm między 160-15	9 pasm między 50-16	—	30
	5°C	160, 117, 85, 79, 28, 26	32, 26, 25, 22, 21	—	34
	5°C	110, 82, 66, 55, 13	—	180, 82, 72, 43, 31, 19	20
	5°C	160, 117, 85, 79	9 pasm między 50-15	—	9
<i>Secale cereale</i>	2°C	46, 30	—	—	35
<i>Hordeum vulgare</i>	0°C	100, 87, 77, 67, 61, 52	56, 32	—	36
<i>Triticum aestivum</i>	3°C	240, 115	—	—	37
	2°C	46, 30	—	—	35
	2°C	200, 48, 47, 42	93, 89, 80, 67, 63	—	23
	2°C	200, 150, 92, 90, 80, 75, 60, 55, 48, 45, 44, 36, 31	105, 79, 75, 60, 53, 51, 49, 45, 44, 43, 42, 41, 38, 35, 34	—	24, 37

Występowanie genu o 74% homologii sekwencyjnej w stosunku do *cor6.6*, stwierdzono również u *Brassica napus v. oleifera cv. Jet Neuf* [48].

In planta białko COR15 podlega przekształceniu w polipeptyd o masie 9.4 kDa, zwany COR15m [43, 44]. Analiza sekwencji aminokwasowej białka COR15 wykazała istnienie na N-końcu fragmentów charakterystycznych dla białek występujących w stromie chloroplastów. Białko to izolowano wyłącznie z liści

roślin hartowanych, natomiast nie stwierdzono jego syntezy w korzeniach [43, 44].

III. Regulacja syntezy białek COR

III-1. Identyfikacja genów *cor*

Do chwili obecnej zidentyfikowano kilkanaście genów, których ekspresja zachodzi pod wpływem niskiej

temperatury (Tab. 2). Część z tych genów została zsekwencjonowana, odczytano również przypuszczalne sekwencje aminokwasowe kodowanych przez nie białek.

III-2. Regulacja ekspresji genów *cor*

W roślinach *A. thaliana* określono etap, na którym zachodzi regulacja ekspresji 4 genów *cor* [15]. Dla genów *cor47*, *cor6.6* oraz *cor160* jest to etap posttranskrypcyjny, a dla genu *cor15* — głównie transkrypcja, choć wydaje się, że podczas procesów posttranskrypcyjnych również działają mechanizmy regulujące [15].

U lucerny ekspresja genu *cas18* jest regulowana

zarówno na poziomie transkrypcji jak i posttranskrypcyjnie [51].

III-3. Wpływ ABA na syntezę białek COR

Pierwsze sygnały o udziale fitohormonów w hartowaniu roślin pochodziły z końca lat 60. Dotychczasowe badania wykazały, że hormonem zaangażowanym w regulację procesu aklimatyzacji roślin do niskiej temperatury może być kwas abscysynowy (ABA). Dowodzą tego następujące fakty:

- 1) poziom endogennego ABA wzrasta podczas hartowania [56, 57, 58];
- 2) podanie ABA w temperaturze pokojowej może

Tabela 2.

Charakterystyka niektórych białek i genów COR indukowanych przez niską temperaturę (C), suszę (D) lub ABA

Gatunek	Gen/plazmid	Czynnik indukujący ekspresję	Białko	Charakterystyka białka	Lit.
<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>cor6.6</i>	C, ABA, D	COR6.6	6.6 kDa, hydrofilne, "boiling-stable", bogate w Gli i Ala, podobne do AFP	38
	<i>cor15</i>	C, ABA, D	COR15	15 kDa, hydrofilne, "boiling-stable" ochrania błony chloroplastów	38 40 38
	<i>cor47</i>	C, ABA, D	COR47	47 kDa, hydrofilne, "boiling-stable", podobne do białek LEA	38 39 42
	<i>cor160</i>	C, ABA, D	COR160	160 kDa, hydrofilne, "boiling-stable"	38 16
	<i>kin1</i>	C, ABA, D	KIN1	6 kDa, hydrofilne, podobne do COR6.6 i AFP	39
	<i>kin2</i>	C, ABA, D	KIN2	6 kDa, podobne do KIN1	49
	<i>lti65</i>	ABA, D, C	LTI65	65 kDa, hydrofilne	50
	<i>lti78</i>	C, ABA, D	LTI78	78 kDa, hydrofilne	50
<i>Brassica sp.</i>	BN28	C	?	?	48
<i>Medicago sp.</i>	<i>cas18</i>	C, ABA, D	CAS18	17.6 kDa, hydrofilne, bogate w Gli i Thr, podobne do LEA	51
	<i>pSM2358</i>	C, ?	?	?	14
	<i>pSM2201</i>	C, ?	?	?	14
	<i>pSM1409</i>	C, ?	?	?	14
	<i>pUM90-1</i>	C, ?	?	?	52
	<i>pUM90-2</i>	C, ?	?	?	52
	<i>pUM90-3</i>	C, ?	?	?	52
	<i>MsaciA</i>	C, ABA, D	?	hydrofilne, bogate w Gli, His, Asn	53
<i>Hordeum vulgare</i>	<i>pAF93</i>	C, D	?	?	54
	<i>pT59</i>	C, ABA?	?	?	54
	<i>pA086</i>	C, ABA?	?	?	54
	<i>pA029</i>	C, ABA?	?	?	54
<i>Spinacia oleracea</i>	?	C	CAP79	79 kDa, podobne do hsc	13
	?	C, D	CAP85	85 kDa, hydrofilne, bogate w Gli, Asn, podobne do <i>cor47</i> i LEA	55

wywołać wzrost mrozoodporności zarówno w całych roślinach [59, 60] jak i w kulturach tkankowych [61, 62];

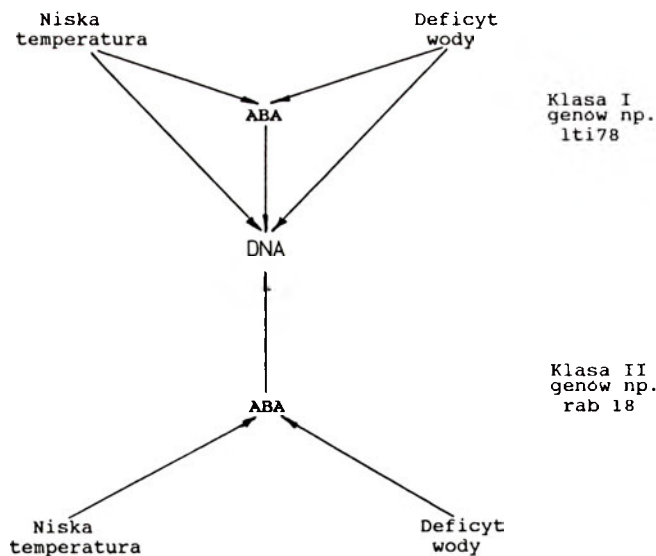
- 3) powodowana przez ABA indukcja tolerancji zamrzania wody w tkankach jest możliwa tylko u tych gatunków, które są zdolne do hartowania pod wpływem niskiej temperatury [19];
- 4) ABA wywołuje zmiany metaboliczne podobne do obserwowanych podczas działania niskiej temperatury [59, 60, 63].
- 5) u mutantów niezdolnych do syntezy ABA lub niewrażliwych na działanie ABA nie obserwuje się procesu hartowania [41, 64].

Aktualne dane na temat roli ABA w aklimatyzacji roślin do niskiej temperatury został zawarty w artykule przeglądowym Lee i Chena [12].

Zmiany syntezy białek podczas hartowania, indukowanego podaniem ABA, obserwowano m.in. u lucerny [51, 65], rzepaku [61, 66], stokłosa [19, 67], ziemniaka [59], ryżu [68, 69] i *A. thaliana* [27, 41]. Stwierdzono, że 4 geny *cor* i 2 geny *lti*, wyizolowane z *A. thaliana*, są indukowane zarówno przez niską temperaturę jak i przez ABA [27, 39, 41, 50].

Jednakże, u wielu badanych roślin ABA indukował syntezę innych polipeptydów niż te, które pojawiały się w wyniku działania niskiej temperatury. U *A. thaliana* niska temperatura powodowała indukcję 11 nowych polipeptydów, podczas gdy ABA — 15. Tylko 8 z nich pojawiało się zarówno u roślin poddanych działaniu chłodu jak i u roślin, którym podano ABA [27]. Podobnie w kulturach komórkowych *Bromus inermis* [19, 70] obraz elektroforetyczny polipeptydów indukowanych lub hamowanych przez chłód lub ABA był różny.

Dane otrzymane dla wielu gatunków roślin sugerują, że niska temperatura i ABA mogą regulować ekspresję genów na dwu niezależnych drogach (Rys. 1). W dzikich roślinach *A. thaliana* podanie egzogennej ABA nie wywołuje tak wysokiego poziomu ekspresji genu *lti78* jak działanie niskiej temperatury [50]. Odwrotna sytuacja występuje w przypadku genu *lti65*, który osiąga najwyższy poziom ekspresji wyłącznie pod wpływem ABA [50]. Propozycja Nordin i w s.p. [71] opiera się również na obserwacjach, że u *abi1*, mutantu *A. thaliana* niewrażliwego na ABA, podanie ABA nie powoduje ekspresji genów *cor*, mimo, że indukcja tych genów zachodzi pod wpływem niskiej temperatury [41, 64]. Poziom transkrypcji pod wpływem niskiej temperatury jest jednak o ok. 50% niższy, niż u roślin typu dzikiego [41]. W roślinach *Solanum commersonii* gen regulowany przez ABA i niską temperaturę wykazuje obniżoną ekspresję w przypadku podania fluoridonu, inhibitora syntezy ABA [72]. Natomiast synteza białka RAB18, indukowanego przez ABA i niską temperaturę, u niewrażliwego na ABA mutantu *A. thaliana* (*abi1*) jest całkowicie zahamowana [73]. Wydaje się więc, że geny indukowane przez niską temperaturę i ABA można



Ryc. 1. Regulacja ekspresji genów przez niską temperaturę, ABA i stres wodny, za Nordin i w s.p. [71], zmodyfikowane.

podzielić na dwie klasy [51]:

- 1) klasa I — geny indukowane przez niską temperaturę, lecz niekoniecznie *via* ABA (np. *lti78*) [50],
- 2) klasa II — geny indukowane przez niską temperaturę wyłącznie za pośrednictwem ABA (np. *rab18*, *lti65*) [50, 71].

Interesujące wydaje się doniesienie o istnieniu specyficznych miejsc regulatorowych (ABRE) w obrębie promotora w genach *rab* [74, 75]. Określenie roli takich miejsc regulatorowych w ekspresji genów indukowanych przez chłód i ABA pozwoli być może odpowiedzieć na pytanie dotyczące roli ABA w odpowiedzi komórek na różne czynniki środowiska.

III-4. Inne czynniki regulujące syntezę białek COR

U *A. thaliana* wszystkie geny *cor* są indukowane przez niską temperaturę, ABA i stres dehydracyjny [39, 41, 50]. Jednak np. u lucerny, niektóre geny regulowane przez niską temperaturę nie są indukowane przez żadne inne czynniki stresowe [14, 31, 65].

Nie stwierdzono, by stres cieplny powodował indukcję białek COR [76].

Podsumowując, u roślin spotykamy 3 typy genów regulowanych przez niską temperaturę:

- 1) geny regulowane wyłącznie przez niską temperaturę [14],
- 2) geny regulowane przez niską temperaturę i ABA [73, 76],
- 3) geny regulowane przez niską temperaturę, ABA i inne czynniki stresowe, np. odwodnienie, zranienie, itp. [76].

V. Rola białek COR

Mimo ogromnej liczby doniesień o pojawieniu się nowych białek pod wpływem niskiej temperatury, rola

i sposób działania tych białek pozostają w zasadzie nieznanymi. W niewielu przypadkach, określenie sekwencji aminokwasowych i poznanie lokalizacji białka na terenie komórki oraz podobieństwo do białek, których funkcja została już poznana, pozwala wysuwać przypuszczenia na temat roli białek COR.

Bardzo atrakcyjna hipoteza dotycząca funkcji białka COR6.6 z *A. thaliana* zakłada, że białko to, podobnie jak białka AFP z ryb [47], może zapobiegać tworzeniu dużych kryształów lodu przez selektywne wiązanie się do ich powierzchni [47, 77]. Białka o podobnej funkcji nagromadzają się w apoplazmie podczas aklimatyzacji pszenicy [78].

Do grupy krioprotektantów zalicza się również białko COR15 [43]. W hartowanych liściach roślin *A. thaliana*, białko to ulega przekształceniom i jest transportowane do stromy chloroplastów, gdzie prawdopodobnie chroni błony tylakoidów przed uszkodzeniami mrozowymi. Zdolność ochronną białka COR15 określono w doświadczeniach *in vitro* jako 1.000.000 razy większą niż sacharozy i 100 — 1000 razy większą niż albuminy [43, 44].

Białko COR47 z *A. thaliana* zarówno pod względem budowy jak i właściwości przypomina białko pojawiające się w liściach pszenicy pod wpływem niskiej temperatury [37, 40]. Oba białka są odporne na wysoką temperaturę. Występowanie białka o podobnych właściwościach (CAP85) stwierdzono również w roślinach szpinaku [55]. Podobieństwo strukturalne tych białek do białek LEA sugeruje, że mogą one chronić struktury komórkowe przed odwodnieniem. Potencjalne znaczenie tych białek w aklimatyzacji do niskiej temperatury wiąże się z odwodnieniem komórki w wyniku pozakomórkowego zamarzania wody i związanego z tym wzrostu stężenia wielu substancji w cytosolu i wakuoli, zmiany siły jonowej i pH roztworu komórkowego, co stwarza warunki sprzyjające denaturacji białek [79, 80]. Potwierdzeniem tej hipotezy może być obserwacja, że gen *rab16A* z ryżu, który koduje białko Grupy II LEA, ulega indukcji pod wpływem niskiej temperatury [68].

Białko CAP79 ze szpinaku, występujące w kilku izoformach może odgrywać ważną rolę w dostosowaniu metabolizmu komórki do warunków stresu niskotemperaturowego [13]. Neven i w s p. [13] proponują, iż CAP79, podobnie jak inne białka z rodziny HSC, może zapobiegać dysocjacji lub agregacji białek a także ułatwiać utrzymanie właściwej ich konformacji [81].

VI. Podsumowanie

Prace nad identyfikacją genów i białek związanych bezpośrednio z procesem nabywania przez rośliny odporności na niską temperaturę prowadzone są z dużą intensywnością. Rozwój technik badawczych, uzyskanie mutantów niezdolnych do aklimatyzacji, mutacje *in vitro* genów przypuszczalnie zaangażowanych

w ten proces lub wprowadzanie do komórek anty-sensownego RNA, pozwoli być może niedługo na wyjaśnienie zarówno roli białek COR, jak i regulacji procesu aklimatyzacji w komórkach roślin poddanych działaniu niskiej temperatury.

Podjęto także próby praktycznego zastosowania uzyskanych już informacji. Wprowadzono np. gen kodujący białko AFP z ryb do rośliny chłodowrażliwej — pomidora i uzyskano, w hodowli komórkowej, mniejszą podatność komórek na uszkodzenia wywołane mrozem [82]. W 1992 roku Murata i w s p. wprowadzili gen kodujący chloroplastową acylotransferazę glicerolo-3-fosforanu z *A. thaliana* do wrażliwych na chłód komórek tytoniu. Spowodowało to u roślin transgenicznych zmniejszenie utraty aktywności fotosyntetycznej pod wpływem niskiej temperatury [83, 84].

Dalsze prace w tym kierunku mogą przyczynić się do otrzymania nowych odmian roślin, odpornych na niekorzystne warunki środowiska.

Podziękowanie

Dziękuję Pani Prof. Alinie Kacperskiej za cenne rady i wskazówki udzielone w trakcie pisania tej pracy.

Artykuł ten powstał w trakcie prac finansowanych przez KBN (Grant nr 4 0139 91 01).

Artykuł otrzymano 8 grudnia 1993 r.
Zaakceptowano do druku 3 marca 1994 r.

Piśmiennictwo

1. Levitt J (1980) W: Responses of Plants to Environmental Stresses t. 1 Chilling, Freezing and High Temperature Stresses, New York, Academic 497 str. wyd. II
2. Sakai A, Larcher W (1987) W: Frost Survival of Plants, Springer-Verlag New York, str 321
3. Kacperska A (1989) W: Li PH (red) Low Temperature Stress Physiology in Crops. CRC Press, Inc. Boca Raton str 27-40
4. Siminovitich D, Briggs DR (1953) *Arch Biochem* 23: 8-17
5. Siminovitich D, Rheaume B, Pomeroy K, Lepage M (1968) *Cryobiology* 5: 202-225
6. Guy CL (1990) *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 41: 187-223
7. Kacperska-Palacz A, Jasińska M, Sobczyk EA, Wciślińska B (1977) *Biol Plant* 19: 18-26
8. Chen HH, Li PH (1980) *Plant Physiol* 66: 414-421
9. Guy CL, Haskell D (1987) *Plant Physiol* 84: 872-878
10. Perras M, Sarhan F (1989) *Plant Physiol* 89: 577-85
11. Weiser CJ (1970) *Science* 169: 1269-1278
12. Lee SP, Chen THH (1992) W: Li PH, Christersson L (red) Advances in Plant Cold Hardiness. CRC Press, Inc. Boca Raton str. 2-29
13. Neven LG, Haskell DW, Guy CL, Denslow N, Klein PA, Green LG, Silverman A (1992) *Plant Physiol* 99: 1362-1369
14. Mohapatra SS, Wolfrail L, Poole RJ, Dhindsa RS (1989) *Plant Physiol* 89: 375-380
15. Hajela RK, Horvath DP, Gilmour SJ, Thomashow MF (1990) *Plant Physiol* 93: 1246-1252
16. Thomashow MF, Gilmour SJ, Lin C (1992) W: Li PH, Christersson L (red) Advances in Plant Cold Hardiness. CRC Press, Inc. Boca Raton str 32-44

17. Meza-Basso L, Alberdi M, Raynal M, Ferrero-Cadinanos ML, Delseny M (1986) *Plant Physiol* **82**: 733-738
18. Chen HHT, Gusta LV (1983) *Plant Physiol* **73**: 71-75
19. Robertson AJ, Gusta LV, Reaney MJT, Ishikawa M (1987) *Plant Physiol* **84**: 1331-1336
20. Guy CL, Niemi K J, Brambl R (1985) *Proc Natl Acad Sci USA* **81**: 3673-3677
21. Tseng M, Li PH (1990) *Physiol Plant* **78**: 538-547
22. Tseng M, Li PH (1991) *Physiol Plant* **81**: 349-358
23. Sarhan F, Perras M (1987) *Plant Cell Physiol* **28**: 1173-1179
24. Perras M, Sarhan F (1990) *Plant Cell Physiol* **31**: 1083-1089
25. Kuznetsov VV, Kimpel JA, Goekijan G, Key JL (1987) *Sov Plant Physiol* **34**: 685-693
26. Gilmour SJ, Hajela RK, Thomashow MF (1988) *Plant Physiol* **87**: 745-750
27. Lang V, Heino P, Palva ET (1989) *Theor Appl Genet* **77**: 729-734
28. Robertson AJ, Gusta LV, Reaney MJT, Ishikawa M (1988) *Plant* **86**: 344-347
29. Guy CL, Haskell D, Yelenosky G (1988) *Cryobiology* **25**: 264-271
30. Mohapatra SS, Poole RJ, Dhindsa RS (1987) *J Exp Bot* **38**: 1697-1703
31. Mohapatra SS, Poole RJ, Dhindsa RS (1987) *Plant Physiol* **84**: 1172-1176
32. Hahn M, Walbot V (1989) *Plant Physiol* **91**: 930-938
33. Guy CL, Haskell D (1988) *Electrophoresis* **9**: 787-796
34. Cloutier Y (1983) *Plant Physiol* **71**: 400-403
35. Perras M, Sarhan F (1989) *Plant Physiol* **89**: 577-585
36. Kurkela S, Borg-Franck M (1992) *Plant Mol Biol* **19**: 689-692
37. Guo W, Ward RW, Thomashow MF (1992) *Plant Physiol* **100**: 915-922
38. Kurkela S, Franck M, Heino P, Lang V, Palva ET (1988) *Plant Cell Rep* **7**: 495-498
39. Kurkela S, Franck M (1990) *Plant Mol Biol* **15**: 137-144
40. Lin C, Guo WW, Everson E, Thomashow MF (1990) *Plant Physiol* **94**: 1078-1083
41. Gilmour SJ, Thomashow MF (1991) *Plant Mol Biol* **17**: 1233-1240
42. Gilmour SJ, Artus NN, Thomashow MF (1992) *Plant Mol Biol* **18**: 13-21
43. Lin C, Thomashow MF (1992) *Bioch Bioph Res Comm* **183**: 1103-1108
44. Lin C, Thomashow MF (1992) *Plant Physiol* **99**: 519-525
45. Thomashow MF (1992) W: Scandalios JG (red) *Advances in Genetics*. Academic Press, Inc. San Diego str 99-131
46. Dure L III, Crouch M, Harada J, Ho THD, Mundy J, Quatrano R, Thomas T, Sung ZR (1989) *Plant Mol Biol* **12**: 475-486
47. Pickett M, Scott G, Davies P, Wang N, Joshi S, Hew C (1984) *Eur J Biochem* **143**: 38-38
48. Orr W, Iu B, White TC, Robert LS, Singh J (1992) *Plant Physiol* **98**: 1532-1534
49. Luo M, Liu JH, Mohapatra S, Hill RD, Mohapatra SS (1992) *J Biol Chem* **267**: 15367-15374
50. Nordin K, Vahala T, Palva ET (1993) *Plant Mol Biol* **21**: 641-653
51. Wolfrain LA, Langis R, Tyson H, Dhindsa RS (1993) *Plant Physiol* **101**: 1275-1282
52. Laberge S, Castonguay Y, Vezina LP (1993) *Plant Physiol* **101**: 1411-1412
53. Grossi M, Cattivelli L, Terzi V, Stanca AM (1992) *Plant Physiol Biochem* **30**: 97-103
54. Houde M, Danyluk J, Laliberte JF, Rassart E, Dhindsa RS, Sarhan F (1992) *Plant Physiol* **99**: 1381-1387
55. Neven LG, Haskell DW, Hofig A, Li QB, Guy CL (1993) *Plant Mol Biol* **21**: 291-305
56. Rikin A, Waldman M, Richmond AE, Dovrat A (1975) *J Exp Bot* **26**: 853-859
57. Irving RM, Lanphear FO (1968) *Plant Physiol* **43**: 9-13
58. Forycka D, Gajowniczek W, Kacperska-Palach A (1978) *Acta Horti* **81**: 77-84
59. Chen HH, Li PH, Brenner ML (1983) *Plant Physiol* **71**: 362-365
60. Lalk I, Dorffling K (1985) *Physiol Plant* **63**: 287-292
61. Johnson-Flanagan AM, Huiwen Z, Thiagarajah MR, Hargurdeep SS (1991) *Plant Physiol* **95**: 1044-1048
62. Xin Z, Li PH (1992) *Plant Physiol* **99**: 707-711
63. Tanino KK, Chen THH, Fuchigami LH, Weiser CJ (1990) *Plant Cell Physiol* **31**: 505-511
64. Heino P, Sandman G, Lang V, Nordin K, Palva ET (1990) *Theor Appl Genet* **79**: 801-806
65. Mohapatra SS, Poole RJ, Dhindsa RS (1988) *Plant Physiol* **87**: 468-473
66. Orr W, Keller WA, Singh J (1986) *J Plant Physiol* **126**: 23-28
67. Lee SP, Chen THH (1993) *Plant Physiol* **101**: 1089-1096
68. Mundy J, Chua NH (1988) *EMBO J* **7**: 2279-2286
69. Mohapatra SS, Poole RJ, Dhindsa RS (1988) *Plant Cell Physiol* **29**: 727-730
70. Lee SP, Chen THH, Fuchigami LH (1991) *Plant Cell Physiol* **32**: 45-56
71. Nordin K, Lang V, Mantyla E, Heino P, Welin B, Baudo M, Holmstrom KO, Palva ET (1992) W: Li PH, Christersson L (red) *Advances in Plant Cold Hardiness* CRC Press, Inc. Boca Raton str 46-56
72. Zhu B, Chen THH, Li PH (1993) *Plant Mol Biol* **21**: 729-735
73. Lang V, Palva ET (1993) *Plant Mol Biol* (w druku)
74. Mundy J, Yamaguchi-Shinozaki K, Chua NH (1990) *Proc Natl Acad Sci* **87**: 1406-1410
75. Pla M, Vilardell J, Gultinan MJ, Marcotte WR, Niogret MF, Quatrano RS, Pages M (1993) *Plant Mol Biol* **21**: 259-266 31-76
76. Lee SP, Zhu B, Chen THH, Li PH (1991) *Physiol Plant* **84**: 41-48
77. Hew CL, Young DSC (1992) *Eur J Biochem* **203**: 33-42
78. Martens E, Griffith M, Mlynarz A, Brush RA (1993) *Physiol Plant* **87**: 499-507
79. Steponkus PL (1984) *Ann Rev Plant Physiol* **35**: 543-584
80. Steponkus PL, Webb MS (1992) W: Somero GN, Osmond CB, Bolis CL (red) *Water and Life: Comparative Analysis of Water Relationships at the Organismic, Cellular and Molecular Level*, Springer-Verlag, Berlin, 338-362
81. Rajashekar C, Burke MJ (1982) W: Li PH, Sakai A (red) *Plant Cold Hardiness and Freezing Stress*, Alan R. Liss, Inc. New York 2: 211-220
82. Hightower R, Baden C, Penzes E, Lund P, Duns-muir P (1991) *Plant Mol Biol* **17**: 1013-1021
83. Murata N, Ishizaki-Nishizawa O, Higashi S, Hayashi H, Tasaka Y, Nishida I (1992) *Nature* (Lond) **356**: 710-713
84. Nishida I, Tasaka Y, Shiraishi H, Murata N (1993) *Plant Mol Biol* **21**: 267-277

**16 th International Congress
of Biochemistry**

New Delhi, India, 19—24 September 1994

Info: The Secretary General, XVI IUBHB

Congress Indian Institute of Science,
Bangalore 560 012, India

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 stworzonych 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(zy) zamierza(ją) włączyć do swego autora artykułu ilustracje publikowane przez autorów prac cytowanych, należy uzyskać i przekazać nam odpowiednią zgodę na przedruk.

Redakcja prosi Autorów o przestrzeganie następujących wskazówek szczegółowych:

TEKST: Maszynopis powinien być napisany jednostronnie czcionką wielkości 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 wydawca. Ilustracji nie należy włączać w tekst maszynopisu, lecz odpowiednio ponumerować: tabele i ryciny noszą cyfry arabskie, wzory zaś rzymskie. Na marginesie tekstu należy zaznaczyć ołówkiem preferowane miejsce umieszczenia tabeli, ryciny, czy wzoru. Tabele odpowiednio porubrykowane, winny być opatrzone jednoznacznym tytułem i ewentualnie także niezbędnymi objaśnieniami. Słowne objaśnienia znaków graficznych można umieścić w podpisie pod ryciną, rysunkowe zaś jedynie na planszy ryciny. Tytuły i objaśnienia rycin sporządza się w postaci oddzielnego wykazu. Ilustracje należy podpisać nazwiskiem pierwszego z autorów i pierwszym słowem tytułu pracy oraz oznaczyć „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 przesłać na adres:

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

Dr Piotr Chomczyński najbardziej cytowanym polskim biochemikiem

Current Contents (Life Sciences) z 6 września 1993, Vol 36, nr 36, w sekcji "This Week Citation Classic" przynosi informację o sukcesie polskiego biochemika dr Piotra Chomczyńskiego, którego praca "Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction", opublikowana w Analytical Biochemistry 162, 156-159, 1987, stała się jedną z najliczniej cytowanych publikacji, w połowie 1993 przewyższyła tu 7330 cytowań. Opracowana przez dr Chomczyńskiego metoda zyskała wielką popularność dzięki sprawdzeniu procedury izolowania całkowitego RNA z tkanek zwierzęcych lub roślinnych do jednostopniowej szybkiej ekstrakcji, charakteryzującej się doskonałą wydajnością i powtarzalnością. Autor zastosował tu tiocyanian guanidyny, związek silnie denaturujący białka i zarazem inhibitor RNaz, oraz ekstrakcję RNA mieszaniną fenolowochloroformową.

Dr Chomczyński jest polskim biochemikiem pracującym obecnie naukowo w USA. Stopień magistra biochemii uzyskał w Uniwersytecie Warszawskim, następnie doktoryzował się w 1971 roku w Instytucie Biochemii i Biofizyki PAN w Warszawie, a habilitację uzyskał w 1978 roku. W Polsce początkowo kierował pracownią biochemii w Instytucie Genetyki i Hodowli Zwierząt PAN w Jastrzębcu, a następnie pracownią biochemii w Zakładzie Weterynarii i Zootechniki SGGW w Warszawie. W Stanach Zjednoczonych pracował w NIAMDD i NIH. Obecnie dr Chomczyński prowadzi Laboratorium Molekularnej Endokrynologii w Zakładzie Endokrynologii i Metabolizmu Uniwersytetu w Cincinnati. Jego badania dotyczą zagadnień związanych z neuro-endokrynologiczną kontrolą ekspresji genu hormonu wzrostu w przysadce człowieka i zwierząt.

Warto przypomnieć, że w latach 50-tych i 60-tych najpopularniejszą metodą ilościowego oznaczania RNA była metoda wykorzystująca relację pentoz z orcyną. Autorem pracy o oznaczaniu pentoz metodą orcynową była Wanda Mejbaum-Katzenellenbogen. Jej oryginalna praca opublikowana w Zeitschrift für Physiologische Chemie 1939, 258, 117 cytowana była w ciągu wielu lat w większości publikacji dotyczących RNA. Niestety nie publikowano wówczas Current Contents. Autorka przed wojną była doktorantką w Zakładzie Chemii Lekarskiej Uniwersytetu Jana Kazimierza we Lwowie. Po wojnie profesor Wanda Mejbaum-Katzenellenbogen była wieloletnim kierownikiem Zakładu Biochemii Uniwersytetu Wrocławskiego.



**3rd International Union of Biochemistry
and Molecular Biology Conference
“MOLECULAR RECOGNITION”
23 to 27 April 1995, Singapore**

SCIENTIFIC PROGRAMME

PLENARY LECTURES INCLUDE :

- * Dr. A R Fersht : Protein Folding
- * Dr. D Metcalf : The Molecular Regulation of Blood Cell Formation
- * Dr. S Nakanishi : Molecular Biology of Glutamate Receptors and their Roles in Brain Functions

SYMPOSIA

SIGNALS AND RECEPTORS

- * Ion channels
- * Inhibins and activins
- * Kinases
- * Phosphatases
- * G proteins and accessory factors
- * Growth factors and cytokines
- * Gaseous mediators

NEUROBIOLOGY

- * Neurodevelopment
- * Neurotrophic factors and receptors
- * Gene regulation in the nervous system
- * Neuronal signalling
- * Neurochemistry of sensor systems
- * Molecular neuropathology
- * Neuroglia

**MOLECULAR RECOGNITION IN
CATALYSIS AND DRUG ACTION**

- * Catalytic centres
- * Protein engineering and unconventional enzymes
- * Drug receptors and drug metabolizing enzymes
- * Toxins
- * Computer modelling of binding sites and drugs
- * Biosynthesis and recognition of glycoconjugates
- * Enzyme biotechnology

MOLECULAR IMMUNOBIOLOGY

- * Major histocompatibility molecules and antigen presentation
- * Vaccine design and development
- * T-cell and B-cell development and function
- * AIDS
- * Gene rearrangements in the immune system
- * Apoptosis
- * Immune modulation in medical therapeutics

Colloquia and Poster Sessions

Welcome reception with cultural show

Mid-week Chinese banquet

Sight-seeing tours in Singapore and neighbouring countries

Trade exhibition

For details contact :

Dr. Hoon-Eng Khoo
Hon. Secretary, 3rd IUBMB Conference
Department of Biochemistry
National University of Singapore
Kent Ridge
Singapore 0511.
Phone : 65-7723250
Fax : 65-7791453
Email : bchkhe@leonis.nus.sg

Conference Secretariat:

Ken-Air DMC Pte Ltd, 35 Selegie Road, #09-19 Parklane Shopping Mall, Singapore 0718
Tel: (65) 336-8857/8 Fax: (65) 336-3613

<http://rcin.org.pl>