

POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE

# POSTĘPY BIOCHEMII

PL ISSN  
0032-5422

## Advances in Biochemistry

TOM 44, NR 4, 1998

Jubileusz profesora Kazimierza Za- krzewskiego . . . . .	274
Insulina i związki wanadu . . . . .	275
Regulacja Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> — ATPazy . . . . .	282
Metabolizm fosfatydyloseryny . . . . .	292
Liposomowe nośniki DNA . . . . .	299
Oligonukleotydy aptameryczne . . . . .	306
Roślinne geny odporności . . . . .	318
Cyjanogeneza u roślin . . . . .	325
Proteazy szoku termicznego . . . . .	334
Białko IHF . . . . .	345
Sprawozdanie PTBioch . . . . .	355
Komunikat o XXXV Zjeździe . . . . .	369

# One Call. One Source. A World of Biomedical Products.

**ICN Pharmaceuticals, Inc.** powstała w 1960 roku. Główna siedziba firmy znajduje się w Costa Mesa, Kalifornia, USA. Jeden z jej działów to **ICN Biomedicals**. Istnieje 20 przedstawicielstw na wszystkich kontynentach, w tym utworzone na początku tego roku przedstawicielstwo w Polsce. **ICN Biomedicals** w swojej ofercie posiada szeroki wachlarz odczynników biomedycznych, które podzielono według następujących dziedzin:



## Cell Biology

Media hodowlane i bakteriologiczne, surowice, antybiotyki, cytokiny i czynniki wzrostu oraz zestawy do ich oznaczania, a także linie komórkowe.



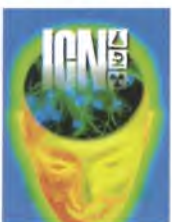
## Immunobiologicals

Odczynniki Cappel<sup>™</sup>, przeciwciała monoklonalne i poliklonalne, wysokiej czystości antygeny, produkty do immunoblotingu, immunoprecypitacji, RIA, EIA, ELISA, odczynniki do badania nowotworów i onkogenów.



## Molecular Biology & Radiochemicals

Odczynniki do izolacji, oczyszczania i analizy kwasów nukleinowych, odczynniki do reakcji PCR, enzymy restrykcyjne, zestawy do chemiluminescencji i bioluminescencji, odczynniki do elektroforezy.



## Neuroscience

Adenozydy, agonistyczne i antagonistyczne czynniki adrenergiczne, cholinergiczne, dopaminergiczne, aminy biogenne i zestawy ELISA do ich oznaczania, inhibitory enzymów, modulatory kanałów jonowych, przeciwciała i czynniki do badania sygnału transdukcji.



Projekt: Piotr Filipiak dla Tauber-promotion, tel./fax: (0 22) 39 00 06

Adres: ICN POLFA Rzeszów S.A. – Biuro Marketingu i Sprzedaży  
**Biomedical Research Products**  
ul. Konduktorska 4/7, 00-775 Warszawa  
Tel. (48 22) 646 51 78; Fax: (48 22) 651 20 35  
Tel. kom. 0 602 49 61 05  
E-mail: [dsryffa@polfacom.pl](mailto:dsryffa@polfacom.pl)



## WYDAWCA

Editor  
POLSKIE TOWARZYSTWO  
BIOCHEMICZNE  
Polish Biochemical Society  
ul. Pasteura 3  
02-093 Warszawa  
Poland  
Email — ptbioch@nencki.gov.pl

Drukarnia Naukowo-Techniczna  
Mińska 65  
03-828 Warszawa

## REDAKCJA

Editorial Board  
REDAKTOR NACZELNY  
Editor in chief  
ZOFIA ZIELIŃSKA  
tel. 831-24-03  
REDAKTORZY  
Editors  
GRAŻYNA PALAMARCZYK  
tel. 658-47-02  
ANDRZEJ JERZMANOWSKI  
tel. 659-70-72 w. 3234  
LILIANA KONARSKA  
tel. 659-85-71 w. 352  
bezp. 658-20-99  
wtorki 15—18  
ANNA SZAKIEL  
tel. 823-20-46  
IWONA FIJAŁKOWSKA  
tel. 659-70-72 w. 1123  
JOLANTA GRZYBOWSKA  
tel. 672-34-38  
HANNA ŁASKOWSKA  
pon. i czw. 14-16  
tel. 659-85-71 w. 441

## RECENZENCI ZESZYTU

Referees of this issue  
KRYSZYNA BOGUCA  
(Warszawa)  
PIOTR CEGŁOWSKI  
(Warszawa)  
ANDRZEJ JERZMANOWSKI  
(Warszawa)  
PIOTR JONCZYK  
(Warszawa)  
JÓZEF KUR  
(Gdańsk)  
WOJCIECH MARKIEWICZ  
(Poznań)  
JANUSZ SIEDLECKI  
(Warszawa)  
ANNA SZAKIEL  
(Warszawa)  
JAN TATOŃ  
(Warszawa)  
KRZYSZTOF ZABŁOCKI  
(Warszawa)

## ADRES REDAKCJI

Address  
REDAKCJA KWARTALNIKA  
„POSTĘPY BIOCHEMII”  
POLSKIE TOWARZYSTWO  
BIOCHEMICZNE  
ul. Pasteura 3  
02-093 Warszawa  
tel. (22) 659-85-71 w. 441  
poniedziałki, czwartki 14<sup>00</sup>-16<sup>00</sup>  
fax (22) 822-53-42  
e-mail: postępy@nencki.gov.pl

## SPIS TREŚCI CONTENTS

<b>Jubileusz profesora Kazimierza Zakrzewskiego — list gratulacyjny</b> . . . . .	274
<b>Insulinopodobne działanie związków wanadu</b> Insulin-like effect of vanadium compounds ANNA KIERSZTAN . . . . .	275
<b>Mechanizmy regulacji Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> — ATPazy w nabłonku kanalików nerkowych</b> The mechanisms of Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> — ATPase regulation in renal tubular epithelium JERZY BEŁTOWSKI . . . . .	282
<b>Fosfatydyloseryna u <i>Prokaryota</i> i <i>Eukaryota</i>. Dekarboxylacja, synteza i transport</b> Phosphatidylserine in <i>Prokaryota</i> and <i>Eucaryota</i> . Decarboxylation, synthesis and transport ANNA DYGAS . . . . .	292
<b>Liposomowe nośniki materiału genetycznego</b> Liposome gene delivery system MAREK LANGNER . . . . .	299
<b>Oligonukleotydy o właściwościach aptamerycznych</b> Oligonucleotides with aptameric properties AGNIESZKA KRAKOWIAK, MARIA KOZIOŁKIEWICZ . . . . .	306
<b>Roślinne geny odporności i ich rola podczas infekcji</b> Plants resistance genes and their role during infection MAGDALENA KRZYMOWSKA . . . . .	318
<b>Cyjanogeneza u roślin</b> Cyanogenesis in plants IRENA SIEGIEŃ . . . . .	325
<b>Rola proteaz szoku termicznego w usuwaniu zdenaturowanych białek z komórek <i>E. coli</i></b> A role of heat-shock proteases in removal of denaturated proteins from <i>E. coli</i> cells EWA ŁASKOWSKA, ALINA TAYLOR . . . . .	334
<b>Białko IHF jako regulator metabolizmu <i>Escherichia coli</i></b> IHF as a regulator of metabolism in <i>Escherichia coli</i> AGNIESZKA SIRKO . . . . .	345
<b>Sprawozdanie z działalności Polskiego Towarzystwa Biochemicznego</b> . . . . .	355
<b>Protokół z Walnego Zebrania Polskiego Towarzystwa Biochemicznego</b> . . . . .	366

**Wielce Szanowny  
Pan Profesor dr hab. Kazimierz Zakrzewski  
Członek Honorowy  
Polskiego Towarzystwa Biochemicznego**

Wielce Szanowny Panie Profesorze,

XXXIV Zjazd Polskiego Towarzystwa Biochemicznego w Białymstoku jest znakomitą okazją do złożenia Panu Profesorowi, Członkowi Honorowemu naszego Towarzystwa, najserdeczniejszych życzeń z okazji jubileuszu osiemdziesiątej rocznicy urodzin.

Ten piękny jubileusz splata się z 40 rocznicą powstania Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, którego losy od samego początku związane były z Osobą Pana Profesora. Listem tym więc pragniemy podziękować Panu Profesorowi za lata pracy na rzecz środowiska biochemicznego, za współtworzenie jego naukowego przedstawiciela jakim jest Polskie Towarzystwo Biochemiczne, za cztery kadencje funkcji jego prezesa i łącznie kilkadziesiąt lat pracy w jego władzach, za godne reprezentowanie naszego środowiska w kraju i na międzynarodowym forum naukowym. To Panu Profesorowi w znacznej mierze Polskie Towarzystwo Biochemiczne zawdzięcza swój dynamiczny rozwój w latach 60-tych oraz przetrwanie trudnego okresu na początku lat osiemdziesiątych. Dziękujemy też za niezwyklej konsekwencję z jaką działał Pan na rzecz rozwoju nauki w Polsce, a w szczególności rozwoju i popularyzacji biochemii i nauk biomedycznych.

Życzymy Panu Profesorowi osobistej satysfakcji z ogromnego dorobku życiowego oraz zdrowia i wszelkiej pomyślności na dalsze długie lata.

Z wyrazami najwyższego szacunku i uznania,

w imieniu  
Biochemików Polskich  
zebranych na XXXIV Zjeździe  
Polskiego Towarzystwa Biochemicznego  
w Białymstoku

*Prezes Polskiego Towarzystwa Biochemicznego  
Prof. dr hab. Liliana Konarska*

Białystok, 15 września 1998 r.

# Insulinopodobne działanie związków wanadu

## Insulin-like effect of vanadium compounds

ANNA KIERSZTAN\*

### Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Charakterystyka związków wanadu
- III. Porównanie mechanizmów działania insuliny i związków wanadu
- IV. Efekty uboczne wywołane przez związki wanadu
- V. Uwagi końcowe

**Wykaz stosowanych skrótów:** IRS 1/2 — substrat kinazy tyrozynowej receptora insulinowego (*insulin receptor substrate 1/2*); SH 2 — region 2 homologii src (*src homology 2*); PI3K — kinaza 3-fosfatydyloinozytolowa (*phosphatidylinositol 3-kinase*); PTP — 2 białkowa fosfataza tyrozynowa (*protein tyrosine phosphatase-2*); GRB-2 — białko wiążące czynniki wzrostowe (*growth factor receptor binder-2*); mSOS — czynnik uczestniczący w wymianie nukleotydów guaninowych (*mammalian son of sevenless*); Ras — białko z rodziny małych białek GTPazowych; Raf — białko o aktywności kinazy Ser/Thr; MAPK — kinaza białkowa aktywowana przez mitogeny (*mitogen activated protein kinase*); C/EBP $\alpha$  — czynnik transkrypcyjny (*CCAAT/enhancer-binding protein  $\alpha$* ); GLUT — nośniki transportujące glukozę; MeAIB — kwas metyloaminoizomasłowy; JAK — kinaza JAK (*Janus kinase*).

### 1. Wstęp

Utrzymanie stałego poziomu glukozy we krwi (4-8 mM) [1] polega na zachowaniu równowagi między jej wytwarzaniem w wątrobie i nerkach a zużyciem przez tkanki zależne od insuliny tj. wątrobę, mięśnie i tkankę tłuszczową, a także przez tkanki względnie niezależne od insuliny takie jak mózg i nerki. Proces ten jest regulowany hormonalnie przez insulinę, glukagon i adrenalinę, przy czym tylko insulina może powodować hipoglikemię. Poza tym insulina wpływa na transport jonów i aminokwasów, metabolizm lipidów, syntezę i degradację białek, transkrypcję określonych genów i replikację DNA oraz wzrost i podziały komórek [2, 3].

Niedobór insuliny lub upośledzenie tkankowej wra-

### Contents:

- I. Introduction
- II. Characteristics of vanadium compounds
- III. Similarity in mechanisms of insulin and vanadium compounds action
- IV. Side effects of vanadium derivatives administration
- V. Concluding remarks

żliwości komórek na ten hormon prowadzi do cukrzycy, której głównym objawem jest hiperglikemia i glukozuria. Cukrzyca występuje u wszystkich ras i grup wiekowych, często prowadzi do ślepoty, miażdżycy (głównie tętnic wieńcowych i mózgowych), udaru mózgu, niewydolności nerek, zgorzeli stopy, uszkodzenia układu nerwowego oraz zwiększenia ryzyka wad wrodzonych u dzieci urodzonych przez kobiety chore na cukrzycę [6]. Cukrzyca jest zaliczana do chorób społecznych, a zachorowalność na nią stale wzrasta. W Europie liczba ludzi chorych na cukrzycę waha się od 1 do 5% [4, 5], a główną przyczyną ich umieralności są przewlekłe powikłania związane z długotrwałym przebiegiem tej choroby [6].

Wyróżnia się wiele form cukrzycy. Jej dwie główne formy to: typ I, który cechuje się zupełną lub prawie zupełną utratą zdolności wydzielania insuliny przez komórki  $\beta$  trzustki na skutek ich autoimmunologicznej destrukcji. U osób z cukrzycą typu I stwierdza się genetyczną predyspozycję do rozwoju choroby. Występuje ona głównie u dzieci i młodzieży, a leczenie jej polega przede wszystkim na podawaniu insuliny [4]. Typ II — to cukrzyca, która jest szczególnie etiologicznie i patogenetycznie niejednorodna i stanowi ona 80-90% wszystkich przypadków cukrzycy. U ludzi z cukrzycą typu II wydzielanie insuliny przez komórki  $\beta$  trzustki jest często wystarczające, aby zapobiec powstawaniu ketozy, ale jest niedostateczne dla utrzymania euglikemii. Z reguły spotyka się upośledzenie komórkowej wrażliwości na insulinę, które nasila się przez otyłość. Cukrzyca typu II występuje najczęściej u ludzi powyżej 40 roku życia. Leczenie jej polega na stosowaniu diety, fizycznego treningu leczniczego, oraz podawaniu insuliny i innych związków obniżających

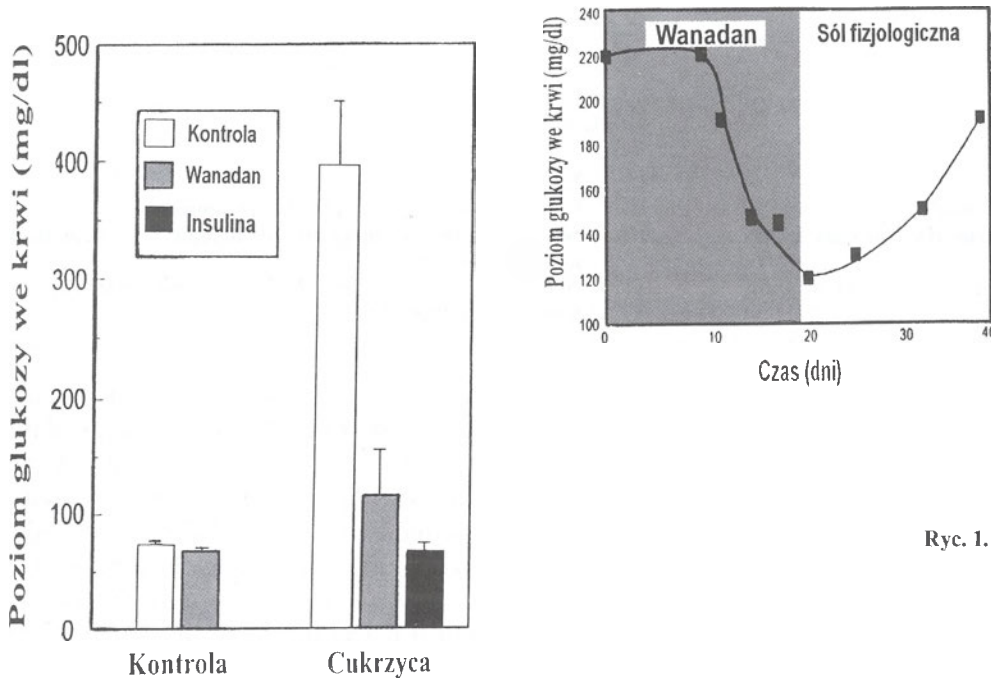
\* Mgr, Zakład Regulacji Metabolizmu, Instytut Biochemii, U.W., ul. Żwirki i Wigury 9-3, 02-089 Warszawa

jących poziom glukozy we krwi tj. głównie pochodnych sulfonylomocznika lub pochodnych biguanidu [1, 4, 5].

Ze względu na to, że u wielu pacjentów obecne metody leczenia nie są wystarczająco skuteczne, trwają poszukiwania doustnych leków powodujących wzmożenie wydzielania insuliny i jednocześnie zwiększenie wrażliwości komórek (tkanek) docelowych na ten hormon. Obecnie testuje się grupę związków zwanych tiazolidinonami [7, 8], które zwiększają wrażliwość na insulinę oraz sole wanadu [9]. W toku badań klinicznych troglitazonu, leku z grupy tiazolidinen-

charakteryzowały się otyłością, hiperinsulinemią, hiperglikemią oraz osłabioną odpowiedzią na insulinę [16-18], u których normalizacja poziomu glukozy we krwi występowała dopiero po 20-50 dniach od podania związków wanadu (Ryc. 1B), w przeciwieństwie do zwierząt z cukrzycą typu I, u których maksymalny efekt widoczny był już po 3-4 dniach.

Pozytywne efekty działania związków wanadu u zwierząt doświadczalnych doprowadziły do rozpoczęcia badań nad zastosowaniem tych związków u ludzi. Dotychczasowe dane wydają się obiecujące, gdyż doustne podawanie metawanadanu sodowego



Ryc. 1. Wpływ wanadanu na poziom glukozy we krwi szczurów z cukrzycą typu I (A) i myszy z cukrzycą typu II (B). Wg A. B. Goldfine i wsp. [20], dzięki uprzejmości autora i Kluwer Academic Publishers.

dionów, zaobserwowano wiele przypadków uszkodzenia wątroby. Jeden z głównych promotorów tego leku (Sigma Glaxo) przerwał badania w tym zakresie.

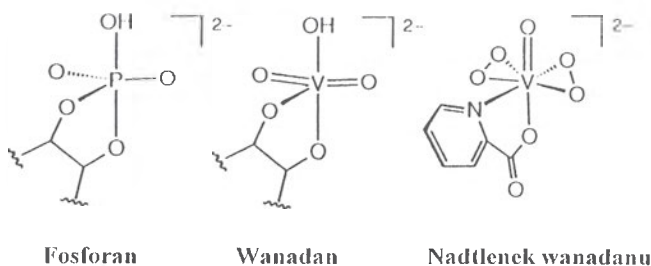
Pierwsze doniesienia o terapeutycznym działaniu związków wanadu sięgają 1979 roku, kiedy zaobserwowano *in vitro* wzrost transportu glukozy i jej utleniania w adypocytach, stymulację syntezy glikogenu w wątrobie i przeponie oraz hamowanie glukoneogenezy w hepatocytach [10-12]. Od tego czasu podobne do insuliny właściwości związków wanadu były szeroko badane początkowo w komórkach takich typów jak: hepatocyty, adypocyty, miocyty [13], a następnie na zwierzętach [14-18]. W roku 1985 stwierdzono, że u szczurów z indukowaną cukrzycą typu I, po podaniu ortowanadanu następuje normalizacja poziomu glukozy we krwi, przy nie zmienionych stężeniach insuliny [14]. Podobny efekt występował również po 3-4 dniach doustnego podawaniu wanadanu lub siarczanu wanadylu szczurom z cukrzycą indukowaną podaniem streptozotocyny (Ryc. 1A) [15] lub alloksanu [19].

Pozytywne wyniki działania związków wanadu zaobserwowano również u zwierząt z cukrzycą typu II (myszy ob/ob i db/db oraz szczurów fa/fa), które

(125 mg dziennie) lub siarczanu wanadyłu (100 mg dziennie) przez 2-3 tygodnie jest dosyć dobrze tolerowane, podnosi wrażliwość na insulinę u pacjentów z cukrzycą typu II jak i u niektórych osób z cukrzycą typu I [20-22]. Dodatkowym efektem jest obniżanie poziomu cholesterolu w surowicy [20]. Interesujące jest również, że korzystne działanie wanadu utrzymuje się jeszcze przez 2 tygodnie po zakończeniu kuracji [21, 22].

## II. Charakterystyka związków wanadu

Wanad należy do grupy metali przejściowych. Jego stopień utlenienia może zmieniać się od -1 do +5. W płynach ustrojowych i zewnątrzkomórkowo stwierdzono występowanie 5-wartościowego wanadanu: metawanadanu  $-VO_3^-$  i ortowanadanu  $-VO_4^{3-}$ . Jest on transportowany do komórek, w których ulega redukcji do 4-wartościowego wanadyłu  $-VO^{2+}$  [23]. W komórkach *in vivo* możliwe jest również spontaniczne utlenianie wanadyłu do wanadanu oraz zachodzenie reakcji odwrotnej [24]. Wanadan może tworzyć polimery oraz oddziaływać z wieloma potencjalnymi ligandami tj.  $NAD^+$ , GDP, ADP [25], a także wiązać się



Ryc. 2. Strukturalne podobieństwo między fosforanem, wanadanem i nadtlenkiem wanadanu. Wg A. Shavera i wsp. [27], dzięki uprzejmości autora i Kluwer Academic Publishers.

z białkami, glutationem, aminokwasami, kwasami nukleinowymi, fosfolipidami i wieloma innymi metabolitami [23, 26]. Ze względu na to, że  $VO_3^-$  ma strukturę podobną do fosforanu (Ryc. 2), może zastępować go w niektórych metabolitach [27], a  $VO_2^{2+}$ , mając podobną wielkość jak jon  $Mg^{2+}$ , może wpływać na reakcje enzymatyczne zależne od tych jonów [13]. Wewnątrzkomórkowe stężenie wanadu w większości tkanek zwierząt wyższych jest mniejsze niż  $0.2 \mu M$  [28], a w czasie podawania tych związków wzrasta do  $10-20 \mu M$  u zwierząt i  $1-5 \mu M$  u ludzi [20, 29].

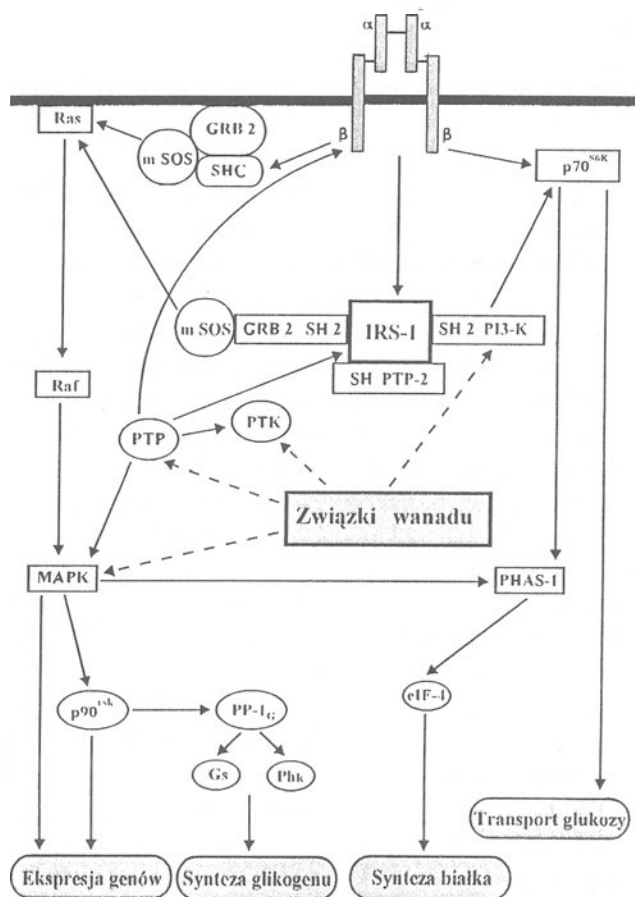
### III. Porównanie mechanizmów działania insuliny i związków wanadu

Na rycinie 3 przedstawiono hipotetyczny mechanizm transdukcji sygnału wywołanego przez insulinę. Przyłączenie hormonu powoduje autofosforylację receptora insulinowego, a w konsekwencji aktywację kinazy tyrozynowej receptora insulinowego, która w większości komórek fosforyluje białko cytosolowe IRS-1 i/lub IRS-2 (ang. *insulin receptor substrate-1/2*) [30, 31]. Ufosforylowane IRS-1/2 może aktywować wiele białek zawierających domeny SH2 np. kinazę 3-fosfatydyloinozytolową (PI3K), fosfatyzę tyrozynową (PTP-2) i białko GRB-2, które tworzy kompleks z mSOS (ang. *guanine nucleotide exchange factor*) i może aktywować białko Ras, a w konsekwencji również kinazę MAP (MAPK). Oddziaływanie IRS-1 z konkretnymi białkami daje określoną odpowiedź komórkową na insulinę, manifestującą się np. zwiększoną syntezą glikogenu w wątrobie, a w komórkach mięśni i tkanki tłuszczowej wzrostem szybkości translokacji nośników glukozy z wnętrza komórki do błony cytoplazmatycznej [20, 30]. W warunkach odysocjowania insuliny od receptora, jego internalizacji i degradacji lub defosforylacji kinazy tyrozynowej receptora insulinowego i białka IRS-1 przy udziale fosfatazy tyrozynowej następuje zahamowanie działania tego hormonu [33].

Na rycinie 3, przedstawiającej mechanizm działania insuliny, zaznaczono również przypuszczalne miejsca działania wanadu. Podobnie jak insulina, związki te normalizują poziom glukozy we krwi w wyniku stymulacji transportu glukozy do komórek mięśni i adypocytów, jej utleniania oraz magazynowania w postaci glikogenu, a także obniżenia szybkości glukoneogene-

zy i degradacji glikogenu [10].

Zwiększona szybkość glikolizy pod wpływem związków wanadu w hepatocytach, adypocytach i komórkach mięśniowych wynika ze zmiany aktywności i zawartości enzymów tego szlaku [34-36]. Podobnie jak insulina, wanadan wpływa na aktywność i ekspresję genów kodujących enzymy kluczowych etapów metabolizmu glukozy. U zwierząt z cukrzycą poziom mRNA glukokinazy i kinazy pirogronianowej w wątrobie spada odpowiednio o 90 i 70%, a po 18 dniach podawania związków wanadu zostaje przywrócony w co najmniej 40% [37]. Poza tym wanadan hamuje aktywność fruktozobisfosfatazy 2, co prowadzi do zwiększania szybkości glikolizy w wyniku aktywacji fosfofruktokinazy 1 przez syntetyzowany w tych warunkach fruktozo-2,6-bisfosforan [38].



Rys. 3. Mechanizm działania insuliny i przypuszczalne miejsca działania związków wanadu. IRS-1 — białko fosforylowane przez kinazę tyrozynową receptora insulinowego (ostatnio uważa się, że nie jest to jedno białko, stąd czasami zapis IRS-1/2), GRB-2 — białko wiążące czynniki wzrostowe, PI3-K — kinaza 3-fosfatydyloinozytolowa, PTP — białkowa fosfataza tyrozynowa, mSOS — (ang. *mammalian son of sevenless*) czynnik biorący udział w wymianie nukleotydów guaninowych, SHC — białko zawierające region 2 homologii src, Ras — białko G o aktywności GTP-azy, Raf — Ser/Thr kinaza białkowa, MAPK — kinaza MAP (kinaza białkowa aktywowana przez mitogeny), p90<sup>RSK</sup> — rybosomalna kinaza białkowa S-6 o masie 90 kDa, p70<sup>S6K</sup> — rybosomalna kinaza S-6 o masie 70 kDa, PP-1<sub>G</sub> — fosfataza syntazy glikogenowej, G<sub>S</sub> — syntaza glikogenowa, Ph<sub>K</sub> — kinaza fosforylaza glikogenowej, PHAS-1 — białko szoku cieplnego (ang. *heat-and acid-stable protein*), eIF-4 — eukariotyczny czynnik transkrypcyjny, PTK — cytosolowa kinaza tyrozynowa. Dalsze wyjaśnienia w tekście.

Podobnie jak insulina, wanadan nie tylko indukuje zwiększoną ekspresję niektórych genów, ale również hamuje ekspresję innych genów. Obniżanie szybkości glukoneogenezy odbywa się w wyniku działania pochodnych wanadu na fosfatazę glukozo-6-fosforanową, która jest końcowym enzymem tego szlaku [39] oraz spadku ekspresji kluczowego enzymu: karboksykinazy fosfoenolopirogronianowej, która w wątrobie zwierząt z cukrzycą wzrasta 15-krotnie [37]. Wanadan może też wpływać na ekspresję genu karboksykinazy fosfoenolopirogronianowej w wyniku modyfikacji C/EBP $\alpha$ , jednego z czynników transkrypcyjnych, związanych z kontrolowaniem przemian energetycznych w komórce [40]. Co więcej, pod wpływem wanadu obserwuje się hamowanie zwiększonej ekspresji mitochondrialnej syntazy 3-hydroksy-3-metyloglutarylo-CoA, regulatorowego enzymu ketogenezy [40], co również nie pozostaje bez znaczenia dla utrzymania poziomu glukozy, gdyż kwasicy ketonowej towarzyszy znaczne nasilenie procesów glukoneogenezy [6].

Poziom glukozy we krwi jest obniżany również w wyniku zwiększonej syntezy glikogenu. Podobnie jak insulina, podawanie pochodnych wanadu powoduje wzrost odkładania glikogenu w wątrobie w wyniku stymulacji aktywności syntazy glikogenowej [41-43] i przywrócenia normalnej aktywności fosforylasy glikogenowej [44]. Takie korzystne działanie wanadu obserwowano u zwierząt z cukrzycą typu I [45].

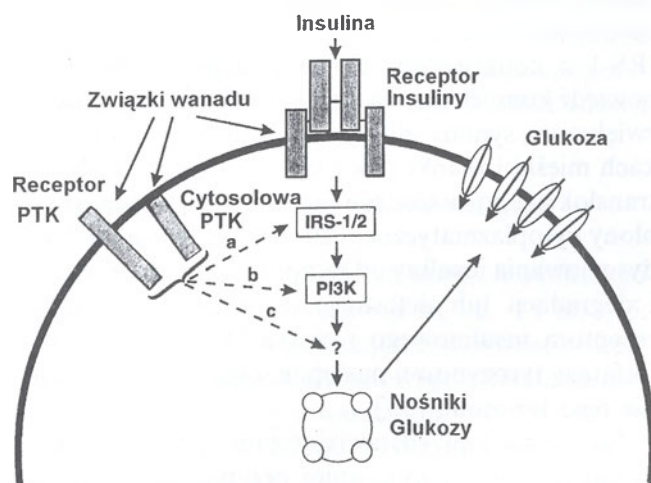
Podobnie jak insulina, wanadan reguluje również metabolizm lipidów. W wątrobie związek ten hamuje lipolizę [46], a także przywraca normalny poziom aktywności kluczowych enzymów lipogenezy tj. karboksylazy acetyloCoA i syntetazy kwasów tłuszczowych [47] oraz liazy cytrynianowej zależnej od ATP [48]. W przypadku dwóch pierwszych enzymów jest to konsekwencją zwiększenia poziomu ich mRNA w wątrobie, czego nie obserwuje się w tkance tłuszczowej [47]. W wątrobie związki wanadu powodują też obniżenie zawartości dehydrogenazy glukozo-6-fosforanowej oraz dehydrogenazy jabłczanowej dekarboksylującej, zwiększanych w czasie trwania cukrzycy [45]. Wanadan stymuluje również uwalnianie lipazy lipoproteinowej z adypocytów szczura, która bierze udział w hydrolizie triacylogliceroli [46].

Podobnie jak insulina, wanadan zwiększa transport glukozy do komórek [9] przy udziale białek błonowych GLUT [67] w wyniku działania na ekspresję genów kodujących te nośniki [37, 68]. Przepuszczalne miejsca stymulacji transportu glukozy przez związki wanadu przedstawia rycina 4. U zwierząt z cukrzycą typu I szybkość ekspresji GLUT 1, występującego prawie we wszystkich komórkach, podobnie jak i GLUT 4, transportera wrażliwego na insulinę w mięśniach szkieletowych i komórkach tkanki tłuszczowej, zostaje zwiększona pod wpływem związków wanadu do poziomu obserwowanego u szczurów kontrolnych [68-70]. U zwierząt z cukrzycą typu I poziom mRNA

GLUT 2, głównego nośnika transportującego glukozę w komórkach  $\beta$  trzustki, wzrasta 2,5-krotnie i obniża się zarówno po podaniu wanadu, jak i insuliny [37]. Natomiast u zwierząt z cukrzycą typu II nie obserwuje się wpływu pochodnych wanadu na ekspresję genów kodujących GLUT 2 [71] i GLUT 4 [72], a zwiększona wrażliwość komórek na insulinę wynika bardziej z usprawnienia funkcjonowania tych nośników niż ze zwiększenia ich ilości [72].

Molekularny mechanizm zwiększania transportu glukozy przez związki wanadu ciągle jest niejasny, gdyż: 1) stymulacja transportu heksoz przez wanadan nie jest blokowana przez kwercetynę, która hamuje aktywność kinazy tyrozynowej receptora insulinowego jak i stymulowany przez insulinę transport heksoz [73], 2) wanadan i nadtlenek wanadu zwiększają szybkość transportu glukozy w obecności wortmaniny, inhibitora kinazy 3-fosfatydyloinozytolowej [74], której aktywność warunkuje zależne od insuliny wbudowywanie w błony transporterów glukozy [75], 3) dodatkowo do mieszaniny inkubacyjnej zarówno wortmaniny jak i inhibitora kinaz tyrozynowych blokuje działanie nadtlenu wanadanu na transport glukozy [74], 4) stymulacja transportu cukrów przez insulinę i związki wanadu jest hamowana przez cytochalazynę D, wskazując na podobieństwo mechanizmów ich działania [9].

Pochodne wanadu nie tylko wpływają na aktywność enzymów związanych z metabolizmem glukozy i lipidów, ale również na aktywność enzymów metabolizmu białek i aminokwasów. Wanadan obniża aktywność aminotransferazy alaninowej, aminotransferazy asparaginianowej oraz arginazy we frakcji cytosolowej i tylko częściowo we frakcji mitochondrialnej, gdy jest podawany szczurom z cukrzycą [49]. Od dawna również wiadomo, że związki wanadu hamują fosfatazy tyrozynowe [50]. Mechanizm inhibicji nie jest do końca wyjaśniony, ale przypuszcza się, że wanadan



Ryc. 4. Wpływ związków wanadu na transport glukozy. Możliwe miejsca działania wskazują strzałki a, b i c. IRS 1/2 — substraty kinazy tyrozynowej receptora insulinowego, PI3-K — kinaza 3-fosfatydyloinozytolowa, PTK — kinaza tyrozynowa. Dalsze wyjaśnienia w tekście. Wg E. Tsiani [9], dzięki uprzejmości autora i Elsevier Science Inc.



jako analog fosforanu przyłącza się do enzymów przenoszących reszty fosforanowe i w ten sposób hamuje ich aktywność [51]. Wpływ związków wanadu na inne enzymy przedstawia tabela 1.

**Tabela 1.**

Wpływ związków wanadu na aktywność wybranych enzymów.

1. Enzymy hamowane przez związki wanadu	Piśmiennictwo
ATPaza Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup>	[52, 53]
ATPaza Ca <sup>2+</sup>	[54, 55]
ATPaza H <sup>+</sup> /K <sup>+</sup>	[56]
ATPaza H <sup>+</sup>	[57]
ATPaza K <sup>+</sup>	[58]
ATPaza Ca <sup>2+</sup> /Mg <sup>2+</sup>	[59]
dehydrogenaza glutaminianowa	[60]
kinaza adenylanowa	[61]
alkaliczna fosfataza	[62]
kwaśna fosfataza	[63]
fosfataza tyrozynowa	[50]
2. Enzymy stymulowane przez związki wanadu	
fosfolipaza C	[64]
kinaza C	[64]
cyklaza adenylanowa	[65]
kinaza 3-fosfatydyloinozytolowa	[66]

Dane na temat wpływu związków wanadu na transport aminokwasów są rozbieżne. W hodowli komórek mięśni szkieletowych L6, w przeciwieństwie do insuliny, wanadan i nadtlenek wanadanu, hamują transport kwasu metyloaminoizomasłowego (MeAIB), nie metabolizowalnego analogu aminokwasów specyficznym przenoszonych przez układ A nośników wrażliwych na insulinę [76]. Natomiast w komórkach mięśni szkieletowych szczura pod wpływem wanadu następuje stymulacja tego układu w wyniku zwiększenia pH wewnątrz komórki [77]. Co więcej, ortowanadan, siarczan wanadylu i acetyloacetonian wanadylu nie wpływają na transport alaniny do hepatocytów królika [60].

Podobne kontrowersje budzi także wpływ wanadu na syntezę i degradację białek. Niektóre doniesienia mówią, że związki wanadu nie wpływają ani na syntezę ani na degradację białek w mięśniach szkieletowych [36], podczas gdy wanadan, podobnie jak insulina, hamuje degradację białek w izolowanych hepatocytach szczura [78]. Mimo, że insulina działa na replikację DNA [3], ortowanadan i metawanadan w stężeniu 2-10 μM w niewielkim stopniu wpływają na szybkość syntezy DNA, natomiast zwiększają o ok. 50% działa-

nie insuliny w badanych hodowlach tkankowych ssa-ków [79].

Pewne wczesne badania sugerowały, że związki wanadu mogą stymulować autofosforylację podjednostki β receptora insulinowego [80]. Sugestie te nie zostały jednak potwierdzone w późniejszych badaniach [15, 81, 82]. Ostatnio przypuszcza się, że niedawno otrzymane syntetyczne pochodne wanadu — nadtlenki wanadanu, oddziałują bezpośrednio z receptorem insulinowym [83]. Jednym z podstawowych mechanizmów działania pochodnych wanadu jest hamowanie białkowych fosfataz tyrozynowych, w szczególności cytosolowych (84, 85). Istotne znaczenie przypisuje się również aktywacji cytosolowej kinazy tyrozynowej [86], której aktywność w adypocytach inkubowanych z wanadanem wzrasta 3-5 razy [87] i/lub kinaz JAK (ang. *Janus kinase*), należących do grupy kinaz tyrozynowych, fosforylujących substraty receptora insulinowego IRS-1 i IRS-2 [88]. O udziale cytosolowej kinazy tyrozynowej w mechanizmie działania wanadu może świadczyć również to, że staurosporyna, silny inhibitor cytosolowych kinaz tyrozynowych, a słaby kinazy tyrozynowej receptora insulinowego, znosi stymulujący efekt działania wanadanu na lipogenezę w adypocytach, a tylko nieznacznie zmniejsza działanie insuliny [86]. W świetle tych obserwacji można wnioskować, że związki wanadu nie muszą działać bezpośrednio na receptor insulinowy, a mimo to miejsca ich działania często pokrywają się ze szlakiem sygnałowym uruchamianym przez insulinę.

Poza aktywacją kinaz tyrozynowych wanadan może również stymulować kinazę MAP (MAPK — *mitogen-activated protein kinase*) oraz kinazę 3-fosfatydyloinozytolową (PI3K — *phosphatidyl inositol 3-kinase*). Obserwowana aktywacja kinaz MAP przez związki wanadu odbywa się w sposób niezależny od kinazy tyrozynowej receptora insulinowego [89] i może wynikać z hamowania aktywności fosfataz kinaz MAP (cytosolowej MKP-1 i/lub jądrowej PAC-1), podczas gdy aktywacja PI3K może odbywać się za pośrednictwem cytosolowej kinazy tyrozynowej [85].

W świetle przedstawionych wyników można wnioskować, że mechanizm działania związków wanadu jest bardzo skomplikowany i należy przeprowadzić jeszcze wiele badań, aby go w pełni wyjaśnić.

#### IV. Efekty uboczne wywoływane przez związki wanadu

Możliwość zastosowania pochodnych wanadu w leczeniu cukrzycy spowodowała, że rozpoczęto również badania dotyczące ich ewentualnego działania ubocznego. Istnieje wiele rozbieżnych doniesień na ten temat, wynikających z tego, że działanie związków wanadu zależy od wielu czynników: użytego związku wanadu, stopnia jego utlenienia, wielkości dawki, sposobu podania oraz czasu trwania terapii [90]. W początkowych etapach badań głównym efektem ubocznym

obserwowanym u zwierząt był obniżony apetyt i zaburzenia żołądkowo-jelitowe, które prowadziły do stanów chorobowych, a nawet śmierci [91]. U zwierząt z cukrzycą doświadczalną, którym przez długi okres czasu podawano doustnie związki wanadu, obserwowano ok. 1000-krotny wzrost stężenia tego pierwiastka w surowicy (do 20  $\mu\text{M}$ ), a nawet wyższy w takich tkankach jak: kości, nerki, wątroba, gdzie wanad jest akumulowany i jego stężenie podnosi się do szczególnie wysokich wartości [92]. Przy podawaniu doustnym związków wanadu w stężeniu 0,4 mg/ml obserwowano obniżoną produkcję spermy u szczurów [91], spadek poziomu hemoglobiny [9], a także toksyczność wanadu na płody szczurów i myszy [91, 93]. Terapeutycznym przeciwwskazaniem stosowania związków wanadu może być również to, że wanad podobnie jak inne pierwiastki przejściowe tj.  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$  może reagować z  $\text{H}_2\text{O}_2$  i powodować powstawanie wolnych rodników hydroksylowych, które mogą zapoczątkować autokatalityczną peroksydację lipidów zawierających nienasycone kwasy tłuszczowe [26, 94]. Istnieją jednak również doniesienia o przeciwutleniających właściwościach związków wanadu [95]. W przeciwieństwie jednak do tych danych doustne podawanie wanadyłu szczurom przez okres 1 roku nie powoduje żadnych zmian hematologicznych i morfologicznych w surowicy krwi oraz nie wpływa na poziom kreatyniny i wątrobowych enzymów cytosolowych [92], wskazując na prawidłowe funkcjonowanie wątroby i nerek.

Jak dotąd niewiele jeszcze wiadomo na temat toksyczności wanadu u ludzi. Wyniki otrzymane dla ludzi są podobne do uzyskanych wcześniej na zwierzętach z cukrzycą typu I i II [15-18, 96-98]. Słabsze działanie wanadu u ludzi może wynikać ze stosowania mniejszych dawek wanadu, mniejszego stężenia tych związków we krwi oraz krótkiego czasu ich działania. Inna jest również wrażliwość ludzi i zwierząt. U gryzoni dawka normalizująca poziom glukozy we krwi wynosi ok.  $100 \text{ mg} \times \text{kg}^{-1} \times \text{dzień}^{-1}$ , podczas gdy u ludzi efekt ten obserwowano przy dawce  $1,5 \text{ mg} \times \text{kg}^{-1} \times \text{dzień}^{-1}$ . W tych warunkach poziom wanadu we krwi zwierząt wahał się między 10-20  $\mu\text{M}$ , a u ludzi 1-5  $\mu\text{M}$ . Najdłuższe jak dotąd badania u ludzi trwały zaledwie 2-3 tygodnie [20] i dlatego konieczne jest przeprowadzenie dłuższych badań celem uzyskania całościowego obrazu działania związków wanadu na homeostazę glukozy, metabolizm węglowodanów i lipidów. Najczęstszym objawem obserwowanym podczas terapii jest nietolerancja żołądkowo-jelitowa. U pacjentów z cukrzycą niezależną od insuliny przez 3 tygodnie podawania siarczanu wanadyłu w dawce  $100 \text{ mg} \times \text{dzień}^{-1}$  [21] oraz u sportowców w czasie 3 miesięcy podawania siarczanu wanadyłu w dawce  $0,5 \text{ mg} \times \text{kg}^{-1} \times \text{dzień}^{-1}$  nie zauważono żadnych znaczących zmian w morfologii krwi oraz parametrach biochemicznych (takich jak: poziom bilirubiny, cholesterolu, triglicerydów, białka, mocznika, kreatyniny

i aminotransferaz: alaninowej i asparaginianowej) [99]. Akumulowanie wanadu w niektórych tkankach podczas leczenia cukrzycy może okazać się poważnym problemem w długotrwałej terapii tymi związkami. Podejmowane są już pierwsze próby podawania tych związków z tironem, chelatującym jony wanadu lub innymi związkami, które eliminowałyby albo przynajmniej zmniejszały jego akumulowanie się w tkankach [91].

## V. Uwagi końcowe

Związki wanadu okazały się użyteczne w poznawaniu funkcji i budowy enzymów, roli fosforylacji reszt tyrozynowych w procesie transdukcji sygnałów komórkowych, a ich działanie insulinopodobne *in vitro* i *in vivo* spowodowało duże zainteresowanie nimi jako potencjalnymi lekami w terapii przeciwcukrzycowej. Co więcej, związki te mogą wzmacniać działanie insuliny i przedłużać trwanie jej efektów metabolicznych, co byłoby szczególnie istotne w terapii cukrzycy II typu. Ostatnio okazało się, że wykazują one również właściwości przeciwbakteryjne [100]. Wiele problemów pozostało jeszcze nie wyjaśnionych. Należą do nich m.in. molekularny mechanizm działania wanadu, a także efekty przeciwstawne do tych wywoływanych przez insulinę na metabolizm białek, mitogenezę i stymulowany przez insulinę transport aminokwasów [101]. Dalsze badania są również niezbędne celem upewnienia się, czy długotrwałe podawanie związków wanadu nie powoduje poważnych działań ubocznych. Syntetyzowane są nowe pochodne o zwiększonej specyficzności działania i zmniejszonej toksyczności w porównaniu ze związkami stosowanymi dotychczas, np. organiczne kompleksy wanadu z maltolem (kwas laryksynowy) lub kwasem kojowym, które charakteryzują się 2-3 krotnie większą skutecznością działania niż siarczan wanadyłu. W czasie ich podawania nie obserwuje się efektów ubocznych, a roztwory tych związków są bardzo stabilne nawet przez kilka miesięcy [9, 102, 103].

## Podziękowania

Serdecznie dziękuję Pani Profesor dr hab. Jadwidze B r y l e za cenne uwagi i pomoc przy pisaniu tego artykułu. Jego przygotowanie było finansowane z funduszy BW 1385/27.

Artykuł otrzymano 22 stycznia 1998 r.  
Zaakceptowano do druku 1 października 1998 r.

## Piśmiennictwo

1. Bailey CJ, Flatt PR, Marks V (1989) *Pharmacol Ther* 42: 361-211
2. Bentley C, Kahn RC (1995) *Endocr Rev* 16: 117-142
3. Saltiel AR (1996) *Am J Physiol* 270: E375-E385
4. Kordowiak AM, Kapusta P, Trzos R, Dziewońska K (1995) *Post Biol Kom* 22: 17-33
5. T a t o ń J (1993) *Diabetologia Praktyczna*, Państwowy Zakład Wydawnictw Lekarskich, Polska, Warszawa

6. Kokot F (1993) W: Brzozowski R (red) *Vademecum Diagnostyki i Terapii*, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Polska, Warszawa, str. 433-451
7. Kaneko T (1997) *Horm Metab Res* **29**: 203-213
8. Henry RR (1997) *Current Therapies for Diabetes* **26**: 553-573
9. Tsiani E, Fantus IG (1997) *Trends Endocrinol Metab* **8**: 51-58
10. Tolman EL, Barris E, Burns M, Pansini A, Partridge R (1979) *Life Sci* **25**: 1159-1164
11. Dubyak GR, Kleinzeller A (1980) *J Biol Chem* **255**: 5306-5312
12. Shechter Y, Karlisch SJD (1980) *Nature (Lond)* **284**: 556-558
13. Brichard SM, Lederer J, Henquin JC (1991) *Diabetes & Metabolisme* **17**: 435-440
14. Heyliger CE, Tahiliani AG, McNeill JH (1985) *Science* **227**: 1474-1477
15. Meyerovitch J, Backer JM, Kahn CR (1989) *J Clin Invest* **84**: 976-983
16. Meyerovitch J, Rothenberg P, Shechter Y, Bonner-Weir S, Kahn CR (1991) *J Clin Invest* **87**: 1286-1294
17. Brichard SM, Baily CJ, Henquin JC (1989) *Endocrinology* **125**: 2510-2516
18. Brichard SM, Baily CJ, Henquin JC (1990) *Diabetes* **39**: 1326-1332
19. Saxena AK (1992) *Europ J Pharmacol* **216**: 123-126
20. Goldfine AB, Simonson DC, Folli F, Patti ME, Kahn CR (1995) *Mol Cell Biochem* **153**: 217-231
21. Cohen N, Halberstam M, Shlimovich P, Chang C J, Shamoon H, Rossetti L (1995) *J Clin Invest* **95**: 2501-2509
22. Halberstam M, Cohen N, Shlimovich P, Rossetti L, Shamoon H (1996) *Diabetes* **45**: 659-666
23. Nechay BR, Nanninga LB, Nechay PSE, Post RL, Grantham JJ, Macara IG, Kubena LF, Phillips TD, Nielsen FH (1986) *Fed Proc* **45**: 123-132
24. Li J, Elberg G, Crans DC, Shechter Y (1996) *Biochemistry* **35**: 8314-8318
25. Crans DC, Mahroof-Tahir M, Keramidas AD (1995) *Mol Cell Biochem* **153**: 17-24
26. Zaporowska H (1995) *Post Biol Kom* **22**: 149-165
27. Shavera A, Ng JB, Hall DA, Posner BI (1995) *Mol Cell Biochem* **153**: 5-15
28. Willsky GR (1990) W: Chasteen ND (red) *Vanadium in Biological Systems*. Kluwer Academic, USA, Boston, str. 1-25
29. Boden G, Chen X, Ruiz J, van Rossum GDV, Turco S (1996) *Metabolism* **45**: 1130-1135
30. Rothenberg PL, Lane WS, Karasik A, Backer JM, White M, Kahn CR (1991) *J Biol Chem* **266**: 8302-8311
31. Sun X, Rothenberg PL, Kahn CR, Backer JM, Araki E, Wilden PA, Cahill DA, Goldstein BJ, White MF (1991) *Nature (Lond)* **352**: 73-77
32. Koch CA, Anderson DJ, Moran MF, Ellis C, Pawson T (1991) *Science* **252**: 668-674
33. Fischer EH, Charbonneau H, Tonks NK (1991) *Science* **253**: 401-406
34. Miralpeix M (1992) *Diabetologia* **35**: 243-248
35. Paquet MR, Romanek RJ, Sargeant RJ (1992) *Mol Cell Biochem* **109**: 149-155
36. Clark AS, Fagon JM, Mitch WE (1985) *Biochem J* **232**: 273-276
37. Brichard SM, Desbuquois B, Girard J (1993) *Mol Cell Endocrinol* **91**: 91-97
38. Rider MH, Bartrons R, Hue L (1990) *Eur J Biochem* **190**: 53-56
39. Sekar N, Li J, Shechter Y (1996) *Crit Rev Biochem Molec Biol* **31**: 339-359
40. Valera A, Rodriguez-Gil JE, Bosch F (1993) *J Clin Invest* **92**: 4-11
41. Blondel O, Simon J, Chevalier B, Portha B (1990) *Am J Physiol* **258**: E459-E467
42. Venkatesan N, Avidan A, Davidson MB (1991) *Diabetes* **40**: 492-498
43. Rossetti L, Laughlin MR (1989) *J Clin Invest* **84**: 892-899
44. Pugazhenth S, Angel JF, Khandelwal RL (1993) *Mol Cell Biochem* **122**: 77-84
45. Khandelwal RL, Pugazhenth S (1995) *Mol Cell Biochem* **153**: 87-94
46. Ueki H, Sera M, Tanaka K (1989) *Arch Biochem Biophys* **272**: 18-24
47. Brichard SM, Ongemba LN, Girard J, Henquin JC (1994) *Diabetologia* **37**: 1065-1072
48. Krivanek J (1994) *Gen Physiol Biophys* **13**: 43-55
49. Upadhyaya SKC, Baquer NZ (1996) *Biochem Mol Biol Int* **40**: 853-860
50. Macara IG, Kustin K, Cantley LC Jr (1980) *Biochim Biophys Acta* **629**: 95-106
51. Huyer G, Liu S, Kelly J, Moffat J, Payette P, Kennedy B, Tsapralis G, Gresser MJ, Ramachandram Ch (1997) *J Biol Chem* **272**: 843-851
52. Cantley LC Jr, Josephson L, Warner R, Yanagisawa M, Lechene C, Guidotti G (1997) *J Biol Chem* **252**: 7421-7423
53. Adams RJ (1980) *Fed Proc* **39**: 979-988
54. Hasselbach W, Medda P, Migala A, Agostini B (1983) *Naturforsch* **38c**: 1015-1022
55. Ronzani N, Stephan L, Hasselbach W (1991) *Eur J Biochem* **201**: 265-272
56. Dafnis E, Spohn M, Lonis B, Kurtzman NA, Sabatini S (1992) *Am J Physiol* **262**: F449-F453
57. Dufour JP, Bontey M, Goffean A (1980) *J Biol Chem* **255**: 5735-5741
58. Furst P, Solioz M (1989) *J Biol Chem* **260**: 50-59
59. Shechter Y (1990) *Diabetes* **39**: 1-5
60. Kiersztan A, Jarzyna R, Bryła J (1998) *Pharmacol Toxicol* **82**: 167-172
61. Chasteen ND (1983) *Struct Bonding* **53**: 105-138
62. Crans DC, Bunch RL, Theisen LA (1989) *J Am Chem Soc* **111**: 7597-7607
63. Vescina CM, Salice VC, Cortizo AM, Etcheverry SB (1996) *Biol Tr Elem Res* **53**: 185-191
64. Wenzel UO, Fouquieray B, Biswas P, Grandaliano G, Choudhury GG, Abboud HE (1995) *J Clin Invest* **95**: 1244-1252
65. Hackbarth I, Schmitz W, Scholz H, Wetzel E, Erdmann E, Krawietz W, Philipp G (1980) *Biochem Pharmacol* **29**: 1439-1442
66. Chen YX, Yang DC, Brown AB, Jeng Y, Tatoyan A, Chan TM (1990) *Arch Biochem Biophys* **283**: 184-192
67. Gould GW, Holman GD (1993) *Biochem J* **295**: 329-341
68. Mountjoy KG, Flier JS (1990) *Endocrinology* **26**: 2778-2787
69. Strout HV, Vicario PP, Biswas C, Saperstein R, Brady EJ, Pilch PF, Berger J (1990) *Endocrinology* **126**: 2728-2732
70. Kopp SJ, Daar J, Paulson DJ, Romano FD, Laddage R (1997) *J Mol Cell Cardiol* **29**: 2355-2362
71. Ferber S, Meyerovitch J, Kriaciunas KM, Kahn CR (1994) *Metabolism* **43**: 1346-1354
72. Brichard SM, Assimacopoulos-Jeannet F, Jeannenaud B (1992) *Endocrinology* **131**: 311-317
73. Shisheva A, Shechter Y (1992) *Biochemistry* **31**: 8059-8063
74. Ida M, Imai K, Hashimoto S, Kawashima H (1996) *Biochem Pharmacol* **51**: 1061-1067
75. Cheatham B, Kahn CR (1995) *Endocr Rev* **16**: 117-142
76. Tsiani E, Abdullah N, Fantus G (1997) *Am J Physiol* **272**: C156-C162
77. Munoz P, Guma A, Camps M, Furiols M, Testar X, Palacin M, Zorzano A (1992) *J Biol Chem* **267**: 10381-10388
78. Seglen PO, Gordon PB (1981) *J Biol Chem* **256**: 7699-7701
79. Hori Ch, Oka T (1980) *Biochim Biophys Acta* **610**: 235-240
80. Tamura S, Brown TA, Whipple JH, Fujita-Yamaguchi Y, Dubler RE, Cheng K, Larner J (1984) *J Biol Chem* **259**: 6650-6658
81. Strout HV, Vicario PP, Saperstein R, Slater EE (1989) *Endocrinology* **124**: 1918-1924
82. Green A (1986) *Biochem J* **238**: 663-669
83. Posner BI, Faure R, Burgess JW, Bevan AP, Lachance D, Zhang-Sun G, Fantus IG, Ng JB, Hall DA, Lum BS in. (1994) *J Biol Chem* **269**: 4596-4604

84. Goldstein BJ (1992) *J Cell Biochem* **48**: 33-42  
 85. Fantus IG, Deragon G, Lai R, Tang S (1995) *Mol Cell Biochem* **153**: 103-112  
 86. Shechter Y, Li J, Meyerovitch J, Gefel D, Bruck R, Elberg G, Miller DS, Shisheva A (1995) *Mol Cell Biochem* **153**: 39-47  
 87. Shisheva A, Shechter Y (1991) *FEBS Lett* **300**: 93-96  
 88. Waters SB, Pessin JE (1996) *Trends Cell Biol* **6**: 1-4  
 89. D'Onofrio F, Le MQ, Chiasson JL, Srivastava AK (1994) *FEBS Lett* **340**: 269-275  
 90. Yale JF, Lachance D, Bevan AP, Vigeant C, Shaver A, Posner BI (1995) *Diabetes* **44**: 1274-1279  
 91. Domingo JL, Gomez M, Sanchez OJ, Hobet JM, Keen CL (1995) *Mol Cell Biochem* **153**: 233-240  
 92. Dai S, Thompson KH, Vera E, McNeill JH (1994) *Pharmacol Toxicol* **75**: 265-273  
 93. Leonard A, Gerber GB (1994) *Mutat Res* **317**: 81-88  
 94. Younes M, Kayser E, Strubelt O (1991) *Toxicology* **70**: 141-149  
 95. Matsubara T, Marcu SM, Misra PH, Dhalla NS (1995) *Mol Cell Biochem* **153**: 79-85  
 96. Brichard SM, Ongemba LN, Henquin JC (1992) *Diabetologia* **35**: 522-527  
 97. Eriksson J W, Lonroth P, Smith U (1992) *Diabetologia* **35**: 510-516  
 98. Ramandham S, Mongold JJ, Brownsey RW, Cros GH, McNeill JH (1989) *Am J Physiol* **257**: H904-H911  
 99. Fawcett JP, Farquhar SJ, Thou T, Shand BI (1997) *Pharmacol Toxicol* **80**: 202-206  
 100. Fukuda N, Yamase T (1997) *Biol Pharm Bull* **20**: 927-930  
 101. Fantus IG & Tsiani E (1998) *Mol Cell Biochem* **182**: 109-119  
 102. Yuen VG, Orvig C, McNeill JH (1995) *Can J Physiol Pharmacol* **73**: 55-64  
 103. Yuen VG, Caravan P, Gelmini L, Glover N, McNeill JH, Setyawati IA, Zbou Y, Orvig C (1997) *J Inorg Biochem* **68**: 109-116

## Mechanizmy regulacji $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPazy w nabłonku kanalików nerkowych

### The mechanisms of $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase regulation in renal tubular epithelium

JERZY BĘLTOWSKI\*

#### Spis treści:

- I. Ogólna charakterystyka  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPazy i jej rola w kanalikach nerkowych
- II. Mechanizmy wewnątrzkomórkowe
  - II-1. Stężenie sodu w komórce
  - II-2. Pochodne kwasu arachidonowego
  - II-3. Procesy fosforylacji i defosforylacji białek
  - II-4. Rola wapnia wewnątrzkomórkowego
- III. Hormonalna regulacja  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPazy
  - III-1. Aminy katecholowe
  - III-2. Angiotensyna
  - III-3. Peptydy natriuretyczne
  - III-4. Tlenek azotu
  - III-5. Parathormon
  - III-6. Hormony sterydowe kory nadnerczy
  - III-7. Insulina
  - III-8. Hormony tarczycy
  - III-9. Inne mediatory
- IV. Podsumowanie

**Wykaz stosowanych skrótów:** PCT — kanalik kręty proksymalny, PST — kanalik prosty proksymalny, mTAL — część rdzenna grubego ramienia wstępującego pętli Henlego, CTAL — część korowa grubego ramienia wstępującego

#### Contents:

- I. General considerations and the role of  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase in renal tubules
- II. Intracellular mechanisms
  - II-1. Intracellular sodium concentration
  - II-2. Arachidonate derivatives
  - II-3. Protein phosphorylation and dephosphorylation
  - II-4. The role of intracellular calcium
- III. Hormonal regulation of  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase
  - III-1. Catecholamines
  - III-2. Angiotensin
  - III-3. Natriuretic peptides
  - III-4. Nitric oxide
  - III-5. Parathyroid hormone
  - III-6. Adrenal corticosteroids
  - III-7. Insulin
  - III-8. Thyroid hormones
  - III-9. Other mediators
- IV. Concluding remarks

pętli Henlego, DCT — kanalik kręty dystalny, CCD — część korowa kanalika zbiorczego, OMCD — część rdzenna zewnętrzna kanalika zbiorczego, IMCD — część rdzenna wewnętrzna kanalika zbiorczego, PKA — kinaza białkowa A, PKG — kinaza białkowa G, PKC — kinaza białkowa C, DARPP-32 — białko regulowane przez dopaminę i cykliczny AMP, PGE<sub>2</sub> — prostaglandyna E<sub>2</sub>, NO — tlenek azotu, 11-βOHS D — dehydrogenaza 11-betahydroksysterydowa, IL-1 — interleukina 1, ET-1 — endotelina 1, EGF — czynnik wzrostu naskórka, NPY — neuropeptyd Y

\* Dr, Katedra i Zakład Patofizjologii Akademii Medycznej, ul. Jaczewskiego 8, 20-090 Lublin

## I. Ogólna charakterystyka $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPazy i jej rola w kanalikach nerkowych

Pompa sodowo-potasowa ( $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPaza) jest enzymem błony komórkowej, który aktywnie transportuje jony sodu z komórek do przestrzeni pozakomórkowej, a jony potasu w kierunku odwrotnym. W każdym cyklu katalitycznym hydroliza 1 cząsteczki ATP dostarcza energii do transportu 3 jonów  $\text{Na}^+$  i 2  $\text{K}^+$ .  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPaza występuje we wszystkich komórkach ustroju ssaków. Reguluje ona skład jonowy i objętość płynu wewnątrzkomórkowego oraz generuje potencjał spoczynkowy komórek pobudliwych [1].  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPaza należy do ATPaz typu P charakteryzujących się przejściowym fosforylowaniem cząsteczki enzymu w każdym cyklu katalitycznym oraz cyklicznymi przekształceniami konformacyjnymi postaci E1 w E2 i odwrotnie [2].

Szpecólnie istotną rolę spełnia  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPaza w kanalikach nefronu. Jest ona odpowiedzialna za wchłanianie zwrotne sodu, a tym samym uczestniczy w regulacji objętości płynów ustrojowych i pośrednio ciśnienia tętniczego.  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPaza znajduje się w błonie bazolateralnej komórek kanalka i aktywnie transportuje jony  $\text{Na}^+$  z komórki do przestrzeni okołokanalikowej. Dzięki temu stężenie sodu w komórce jest niskie, co umożliwia bierne wnikanie tego kationu z płynu kanalikowego przez przenośniki znajdujące się w błonie luminalnej [3]. Różnica stężeń jonów  $\text{Na}^+$  pomiędzy płynem pozakomórkowym i wnętrzem komórki powstająca przy udziale  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPazy dostarcza też energii do transportu innych substancji np. glukozy, aminokwasów i fosforanów [2].

Nerki są najbogatszym w  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPazę narządem w ustroju, z nich też otrzymano po raz pierwszy enzym w postaci oczyszczonej [4].  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPaza występuje we wszystkich odcinkach kanalka, największą aktywność stwierdza się w części rdzennej ramienia wstępującego pętli Henlego (mTAL) i kanalku krętym dystalnym (DCT), pośrednią w kanalku proksymalnym i zbiorczym, a najmniejszą w części cienkiej pętli Henlego [2-4]. Aktywność  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPazy w poszczególnych odcinkach nefronu jest skorelowana z natężeniem transportu sodu [4].

Cząsteczka enzymu składa się z podjednostek  $\alpha$  i  $\beta$  [4]. Podjednostka  $\alpha$  zawiera miejsce katalityczne oraz miejsca wiążące ATP, ouabainę (strofantynę G) oraz transportowane kationy. Podjednostka  $\beta$  jest glikoproteiną, dokładna jej rola nie została poznana [4]. Podjednostka  $\alpha$  występuje w 3 odmianach:  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  i  $\alpha 3$ , a podjednostka  $\beta$  co najmniej w dwóch ( $\beta 1$  i  $\beta 2$ ), przy czym w nerkach przeważa izoenzym  $\alpha 1\beta 1$  [5, 6]. U królika  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPaza w części proksymalnej nefronu charakteryzuje się mniejszą wrażliwością na działanie ouabainy niż w kanalikach zbiorczych. Nie wiadomo, czy wynika to z obecności w tych odcinkach kanalka enzymu zawierającego odpowiednio podjednostki  $\alpha 1$  i  $\alpha 3$ , czy też różne odmiany podjednostki  $\alpha 1$

[7, 8]. U szczura obie formy, odporna i wrażliwa na ouabainę występują na całej długości nefronu [9].

Ze względu na funkcje, jakie spełnia  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPaza w nerkach, regulacja tego enzymu budzi duże zainteresowanie. Mechanizmy tej regulacji zostały bliżej poznane dzięki opracowaniu czułych metod oznaczania aktywności enzymu w poszczególnych częściach nefronu. Aktywność katalityczna  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPazy jest mierzona na podstawie ilości fosforanu nieorganicznego uwolnionego z ATP. Miernikiem aktywności transportowej jest wrażliwe na ouabainę wychwytywanie radioaktywnego rubidu ( $^{86}\text{Rb}^+$ ) przez izolowane komórki. Możliwe jest też określanie ilości cząsteczek  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPazy w błonie komórkowej na podstawie wiązania przez komórki znakowanej ouabainy [10].

Mechanizmy uczestniczące w regulacji  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPazy w komórkach kanalików nerkowych można podzielić na krótko- i długodziałające. Regulacja krótkotrwała odbywa się poprzez: 1) zmiany stężenia sodu w komórce, 2) zmiany aktywności cząsteczek  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPazy lub jej powinowactwa do substratu (ATP) i aktywatorów, 3) redystrybucję enzymu między pulą aktywną (błonową) i nieaktywną (wewnątrzkomórkową). Czynniki które wpływają na biosyntezę lub degradację  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPazy powodują długotrwałe zmiany jej aktywności [11].

W regulacji  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPazy uczestniczy szereg hormonów, które działają za pośrednictwem różnych dróg wewnątrzkomórkowego przekazywania sygnałów.

## II. Mechanizmy wewnątrzkomórkowe

### II-1. Stężenie sodu w komórce

Istotną rolę w regulacji  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPazy odgrywa wewnątrzkomórkowe stężenie sodu. Maksymalną aktywność osiąga ona przy stężeniu  $\text{Na}^+$  ok. 100 mM, tymczasem w komórce jest ono wielokrotnie mniejsze [4]. Oznacza to, że enzym nie działa na „pełnych obrotach”, wykorzystuje on zwykle tylko 20-40% maksymalnej aktywności [3]. Zależność aktywności  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPazy od stężenia  $\text{Na}^+$  może być wyrażona równaniem Hilla: [12, 13]

$$v = V_{\max} \frac{[\text{Na}^+]^n}{[\text{Na}^+]^n + [\text{K}_{0.5}]^n}$$

gdzie:  $v$  — aktywność  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPazy przy stężeniu sodu  $[\text{Na}^+]$ ,  $V_{\max}$  — maksymalna aktywność  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPazy przy optymalnym stężeniu sodu,  $\text{K}_{0.5}$  — stała powinowactwa enzymu do sodu (stężenie  $\text{Na}^+$  przy którym  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPaza osiąga 50% maksymalnej aktywności),  $n$  — współczynnik Hilla wyrażający dodatnią kooperację poszczególnych miejsc wiążących  $\text{Na}^+$  ( $n > 1$ ). Wartość  $\text{K}_{0.5}$  wynosi od 25 mM w kanalku zbiorczym [14] do 45 mM w kanalku proksymalnym [15].

Stężenie  $\text{Na}^+$  w komórkach kanalików nerkowych zależy od napływu tego kationu przez przenośniki znajdujące się w błonie luminalnej [16]. Zwiększony napływ sodu powoduje aktywację  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPazy, co przywraca prawidłowe stężenie tego kationu w komórce i wzmacnia jego wchłanianie zwrotne [17].

Długotrwały wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia sodu zwiększa ilość aktywnych cząsteczek  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPazy i tym samym  $V_{\text{max}}$ . Efekt ten występuje po kilkunastu minutach i nie jest zależny od syntezy nowych cząsteczek enzymu, ale od aktywacji cząsteczek uprzednio nieczynnych lub ich rekrutacji z magazynów wewnątrzkomórkowych do błony [18, 19]. Ta „zapasowa” pula enzymu nie występuje u zwierząt, którym usunięto nadnercza, co wskazuje że jest ona zależna od kortykosterydów [18, 20, 21]. Po dłuższym czasie zwiększa się synteza enzymu *de novo* [3]. Natomiast długotrwałe zahamowanie napływu sodu do komórki zmniejsza ilość aktywnych cząsteczek  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPazy w błonie komórkowej [19].

## II-2. Pochodne kwasu arachidonowego

Eikozanoidy odgrywają istotną rolę w regulacji aktywności  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPazy w komórkach kanalików nerkowych na drodze autokrynej lub parakrynej. Mogą być one również wewnątrzkomórkowymi przekazywanymi w działaniu różnych hormonów.

Kwas arachidonowy jest metabolizowany w kanalikach zbiorczych przez cyklooksygenazę do prostaglandyny  $\text{E}_2$  [22, 23], która ma silne działanie natriuretyczne [24].  $\text{PGE}_2$  hamuje transport sodu w mTAL, CCD i IMCD [16, 25]. U szczurów, którym podawano inhibitor cyklooksygenazy, indometacynę, aktywność  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPazy była zwiększona w mTAL, oraz w PCT, PST, CTAL, CCD, a zmniejszona w DCT [26, 27]. Podawanie indometacyny królikom także powoduje wzrost aktywności  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPazy w CCD [28]. *In vitro*  $\text{PGE}_2$  zmniejsza aktywność  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPazy w mTAL [26-29], CCD [27, 30-32] oraz PCT, PST i CTAL, a zwiększa w DCT [27].  $\text{PGE}_2$  zmniejsza wrażliwość na ouabainę zużycie tlenu i wychwytywanie znakowanego rubidu w komórkach części rdzennej wewnętrznej kanalików zbiorczych [25].

Mechanizm działania  $\text{PGE}_2$  nie jest znany. Sugeruje się, że może być ona allosterycznym inhibitorem  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPazy działając na to samo miejsce enzymu, co ouabaina [25, 33, 34]. Inne badania wskazują na bardziej złożony, receptorowy mechanizm działania.  $\text{PGE}_2$  nie hamuje  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPazy wyizolowanej z korowej części kanalików zbiorczych w preparatach bezkomórkowych [28], natomiast zmniejsza liczbę cząsteczek  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPazy w błonie komórek tej części nefronu prawdopodobnie przyspieszając ich endocytozę [35]. Podobne działanie obserwowano w hodowlach komórkowych [36].

W niektórych badaniach wykazano, że działanie

$\text{PGE}_2$  zależy od hamowania napływu sodu do komórki [32], w innych natomiast nie wykazano takiej zależności [29, 37]. Prawdopodobnie więc mechanizm działania  $\text{PGE}_2$  jest różny w różnych odcinkach nefronu.

Dużą aktywność w nerkach wykazuje szlak przemian kwasu arachidonowego zależny od cytochromu P450 [38-40]. Jego produktami są:

- 1) kwasy: 19- i 20-hydroksyarachidonowy (19- i 20-HETE) oraz 20-karboksyarachidonowy (20-COOH-AA) powstające na drodze  $\omega/\omega-1$  hydroksylacji,
- 2) kwasy epoksyekoizatrienowe (5,6-EET, 8,9EET, 11,12-EET i 14,15-EET) oraz produkty ich hydrolizy, kwasy dihydroksyeikoizatrienowe (DHT),
- 3) kwasy hydroksyeikoizatetraenowe (HETE) powstające na drodze reakcji lipooksygenazopodobnej.

5,6-EET hamuje  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPazę w komórkach kanalików proksymalnych [41]. Podobne działanie w tej części nefronu ma 20-HETE [42-44], 12(R)-HETE, i 11,12-DHT [43] oraz 16- i 17(S)-HETE [45]. 20-HETE i 20-COOH-AA zmniejszają wychwytywanie znakowanego rubidu przez komórki mTAL królika [46, 47]. 5,6-EET, 11,12-EET, 11,12-DHT i 12(R)-HETE hamują  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPazę w korowej części kanalików zbiorczych szczura w sposób zależny od dawki [32].

Mechanizm działania tej grupy mediatorów jest prawdopodobnie różnorodny. Ich działanie na  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPazę nie wynika z blokowania napływu sodu do komórki [32]. Wydaje się, że w niektórych przypadkach działają one na enzym bezpośrednio. 20-COOH-AA, 20-HETE i 12(R)-HETE hamują izolowaną  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPazę w preparatach bezkomórkowych [48-50]. Nie jest to jednak mechanizm uniwersalny, ponieważ np. 20-HETE zmniejszający aktywność  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPazy w kanalikach proksymalnych [42] nie ma takiego działania na enzym izolowany z tej części nefronu [45]. 20-HETE działa w tych komórkach prawdopodobnie za pośrednictwem kinazy białkowej C [44].

Na uwagę zasługuje odmienne działanie różnych izomerów pochodnych kwasu arachidonowego. Na przykład 19(S)-HETE pobudza  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPazę wyizolowaną z mikrosomów kory nerek, natomiast 19(R)-HETE nie wpływa na jej aktywność [49, 50]. 12(R)-HETE hamuje  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPazę w komórkach CCD szczura, zaś 12(S)-HETE nie ma takiego działania [32]. Podobnie wyłącznie izomery S 16- i 17-HETE hamują  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPazę wyizolowaną z komórek PCT królika [45].

## II-3. Procesy fosforylacji i defosforylacji białek

Ważną rolę w regulacji  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPazy mają kinazy białkowe i fosfatazy fosfoproteinowe, przy czym najczęściej badań na ten temat poświęcono jak dotychczas roli kinaz białkowych C i A.

Aktywatory kinazy białkowej C — estry forbolu zmniejszają aktywność  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPazy w izolowanych kanalikach proksymalnych [51, 52]. W innych badaniach [53] obserwowano dwufazowe działanie aktywatora PKC (diacyloglicerolu) w tej części nefronu — początkowo następował wzrost, a następnie spadek zużycia tlenu wrażliwego na ouabainę. W mTAL i CCD estry forbolu nie wpływają na aktywność  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPazy [52].

Działanie kinazy białkowej A zależnej od cyklicznego AMP także jest różne w różnych odcinkach kanalika. Aktywator cyklicznej adenylowej (forskolina) i egzogenne analogi cyklicznego AMP pobudzają  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPazę w kanaliku proksymalnym [54, 55]. Są również doniesienia o braku działania cAMP w tej części nefronu [52, 56]. Analogi cAMP lub egzogenne aktywatory cyklicznej adenylowej zmniejszają aktywność  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPazy w mTAL [52, 57-59] i CCD [60]. W części rdzennej kanalików zbiorczych cAMP nie wpływa na aktywność  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPazy [61].

Kinazy białkowe mogą modyfikować aktywność  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPazy na drodze różnych mechanizmów, co tłumaczy ich odmienne działanie w różnych częściach nefronu albo nawet w tych samych komórkach w różnych warunkach. Kinaza może fosforylować samą cząsteczkę ATPazy wpływając na jej aktywność lub szybkość wbudowywania albo usuwania enzymu z błony komórkowej. Może też fosforylować inne białko błonowe regulujące aktywność ATPazy. Wreszcie kinazy mogą pobudzać syntezę pochodnych kwasu arachidonowego, które wpływają na aktywność enzymu jako „trzeciorzędowe” przekaźniki [62].

Wykazano, że PKC oraz podjednostka katalityczna kinazy A fosforylują izolowaną podjednostkę  $\alpha$   $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPazy [63-65]. Aktywacja kinaz zawartych w komórkach przez egzogenne aktywatory także prowadzi do fosforylowania  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPazy [64, 66, 67]. Fosforylowanie zmniejsza aktywność enzymu [63]. Ufosforylowana  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPaza może być defosforylowana przez fosfatazy białkowe typu 1, 2a i 2b, co prowadzi do jej reaktywacji [63].

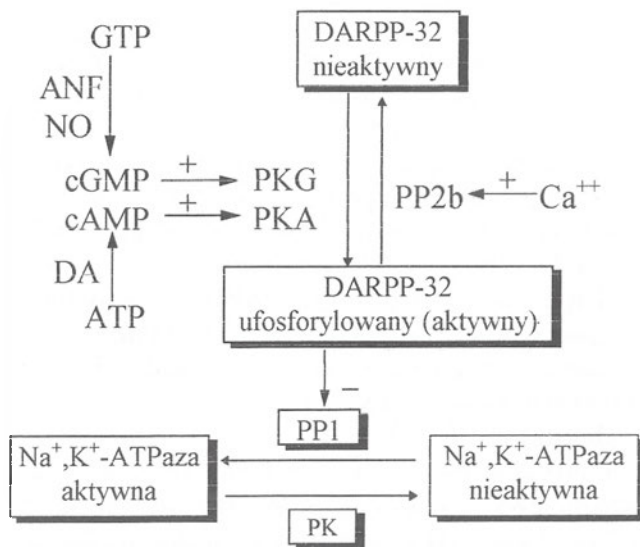
Kinazy białkowe mogą w niektórych odcinkach nefronu pobudzać syntezę pochodnych kwasu arachidonowego zależnych od cytochromu P450, które pełnią rolę „przekaźników trzeciego rzędu” w hamowaniu  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPazy. Pogląd ten jest oparty na fakcie, że inhibitor fosfolipazy  $\text{A}_2$ , mepakryna znosił hamujące działanie cAMP na  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPazę w CCD [60] i mTAL [52]. Cykliczny AMP pobudza syntezę 19-HETE, 20-HETE i 20-COOH-AA hamujących  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPazę w mTAL [48]. Inhibitory cytochromu P450 — etoksyresorufina, SKF 525A i  $\text{CoCl}_2$  zapobiegają działaniu dibutyrylo-cAMP na  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPazę w korowej części kanalików zbiorczych [32]. Mepakryna i etoksyresorufina zapobiegają także hamowaniu  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPazy przez estry forbolu w komórkach kanalików proksymalnych [43, 52].

Mechanizm aktywacji przemian kwasu arachidono-

wego przez kinazy białkowe pozostaje niejasny. Istnieje hipoteza, że fosforylują one komórkowe białko — lipomodulinę, która staje się wówczas nieaktywna i przestaje hamować fosfolipazę  $\text{A}_2$  [52, 60, 68].

W mTAL hamowanie  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPazy przez cAMP może być wynikiem nie tylko aktywacji fosforylowania, ale również hamowania defosforylowania białek (Ryc. 1). Kinaza A fosforyluje białka DARPP-32 i I-1 będące endogennymi inhibitorami fosfataz białkowych DARPP-32 i I-1 w postaci ufosforylowanej hamują fosfatazy typu 1 i 2a zwiększając stopień ufosforylowania białek [69]. W mTAL wykryto dużą aktywność fosfatazy typu 1 [70] oraz obecność inhibitorów DARPP-32 i I-1 [71, 72]. Wykazano też, że ufosforylowany DARPP-32 zmniejsza maksymalną aktywność  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPazy w tej części nefronu [59]. Egzogenne inhibitory fosfataz: kwas okadejowy i kalikulina A także zmniejszają  $V_{\text{max}}$   $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPazy w mTAL, prawdopodobnie w wyniku hamowania fosfatazy typu 1 [70]. Kwas okadejowy podawany *in vivo* również zmniejsza aktywność  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPazy w części rdzennej nerek [73].

Do wyjaśnienia mechanizmu działania kinaz przyczyniły się znacznie badania Feraille i wsp [13]



Ryc. 1. Udział endogennych inhibitorów fosfataz białkowych w regulacji  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPazy.

W komórkach ramienia wstępującego pętli Henlego dopamina zwiększa aktywność cyklicznej adenylowej. Zwiększony poziom cAMP powoduje aktywację kinazy białkowej A, która fosforyluje DARPP-32. Ufosforylowany DARPP-32 staje się aktywnym inhibitorem fosfatazy białkowej typu I (PP1). Prowadzi to do zahamowania defosforylacji  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPazy lub innego białka regulatorowego i spadku aktywności tego enzymu. Podobnie do dopaminy może działać przedsiorkowy czynnik natriuretyczny (ANF) oraz tlenek azotu (NO) aktywujące odpowiednio błonową oraz cytoplazmatyczną cyklazę guanylową i zwiększające poziom cGMP w komórce. cGMP aktywuje kinazę białkową G, która fosforyluje DARPP-32. Kinazy białkowe (PK) mogą też bezpośrednio zmniejszać aktywność  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPazy fosforylując cząsteczkę enzymu lub białka regulującego jego aktywność. Zwiększony poziom wapnia w komórce np. pod wpływem angiotensyny lub noradrenaliny aktywuje fosfatazę białkową typu 2b (PP2b, kalcyneurynę), która defosforyluje DARPP-32. Prowadzi to do aktywacji fosfatazy typu 1 i wzrostu aktywności  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPazy.

wykonane na świeżo izolowanych komórkach kanalikula proksymalnego nerki szczura. Autorzy ci stwierdzili, że kierunek zmian aktywności  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPazy w wyniku aktywacji kinazy C zależy od prężności tlenu. W warunkach niskiej prężności tlenu (stosowanej w większości badań *in vitro*) estry forbolu zmniejszały  $V_{\max}$   $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPazy. Jeśli jednak komórki inkubowano w środowisku o podwyższonym  $\text{pO}_2$  estry te nie miały wpływu na  $V_{\max}$  enzymu, zwiększały natomiast jego powinowactwo do sodu, co jest wynikiem fosforylowania podjednostki  $\alpha$  [74]. W warunkach hipoksji bezpośredni pobudzający wpływ PKC jest prawdopodobnie maskowany w wyniku nasilonej pod wpływem tej kinazy syntezy pochodnych kwasu arachidonowego hamujących  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPazę [13]. W komórkach do których wprowadzono zmutowaną podjednostkę  $\alpha$ , pozbawioną miejsca fosforylowanego przez PKC, aktywacja tej kinazy prowadziła do spadku, a nie wzrostu aktywności  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPazy niezależnie od warunków tlenowych [75]. Wykazano również, że aktywacja kinazy A zwiększa, w wyniku fosforylowania podjednostki  $\alpha$   $V_{\max}$   $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPazy w komórkach PCT inkubowanych w środowisku o dużej prężności tlenu [76].

Mniej badań poświęcono jak dotychczas znaczeniu kinazy białkowej G. Jej aktywator, 8-bromo-cGMP zmniejsza ouabaino-wrażliwe zużycie tlenu w komórkach IMCD [61]. 8-bromo-cGMP hamuje  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPazę w rdzeniu nerek w wyniku aktywacji kinazy G, co wykazano zarówno *in vitro* [77, 78], jak i *in vivo* [73]. Istnieją sugestie, że kinaza G, podobnie jak kinaza A, fosforyluje inhibitory fosfataz białkowych: DARPP-32 i I-1 [77, 78] (Ryc. 1). Wykazano, że PKG może fosforylować DARPP-32 w tkankach pozanerkowych [79, 80]. Nasze badania sugerują natomiast, że kinaza G może wzmacniać syntezę pochodnych kwasu arachidonowego zależnych od cytochromu P450 [81].

Oprócz omówionych dotychczas kinaz serynowo-treoninowych istnieją także dane wskazujące na udział kinaz tyrozynowych w regulacji  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPazy. Kinazy te wchodzi między innymi w skład receptora insulinowego. Aktywacja kinazy tyrozynowej w komórkach kanalików proksymalnych zwiększa powinowactwo  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPazy do sodu nie zmieniając  $V_{\max}$ . Sugeruje to fosforylowanie N-terminalnej części podjednostki  $\alpha$ , podobnie jak ma to miejsce w wyniku działania kinazy białkowej C [82].

#### II-4. Rola wapnia wewnątrzkomórkowego

Badania na izolowanych komórkach kanalikula proksymalnego wykazały, że wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia  $\text{Ca}^{2+}$  zwiększa aktywność  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPazy w wyniku aktywacji kalcyneuryny — fosfatazy białkowej typu 2b zależnej od wapnia i kalmoduliny [83, 84]. Inhibitor kalcyneuryny — FK506 hamuje podstawową aktywność  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPazy

w mTAL, CCD i OMCD [85, 86]. Wskazuje to, że napływ wapnia do komórki inicjuje procesy defosforylacji białek prowadzące do aktywacji  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPazy (Ryc. 1).

### III. Hormonalna regulacja $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPazy

#### III-1. Aminy katecholowe

Dopamina (DA) jest istotnym czynnikiem regulującym wydalanie sodu. Jest ona syntetyzowana w komórkach kanalikula proksymalnego, a jej działanie natriuretyczne wynika zarówno z wpływu na naczynia nerkowe, jak i z hamowania cewkowego transportu sodu. Dopamina zmniejsza wchłanianie  $\text{Na}^+$  na skutek hamowania  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPazy oraz wymieniacza  $\text{Na}^+ \text{H}^+$  [62, 87]. Hamowanie  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPazy przez dopaminę wykazano *in vitro* w kanaliku proksymalnym [51, 88], części grubej ramienia wstępującego pętli Henlego [59] oraz korowej części kanalikula zbiorczego [60, 89].

W kanalikach proksymalnych występują receptory dopaminergiczne  $\text{DA}_1$  aktywujące zarówno fosfolipazę C jak i cyklazę adenylową [87, 90] oraz  $\text{DA}_2$  hamujące cyklazę adenylową [91]. Według niektórych doniesień [92] działanie dopaminy w PCT wynika z aktywacji receptorów  $\text{DA}_1$ , według innych natomiast [56, 93] konieczne jest równoczesne pobudzenie receptorów  $\text{DA}_1$  i  $\text{DA}_2$ . Dopamina hamuje  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPazę w kanaliku proksymalnym w wyniku aktywacji fosfolipazy C uwalniającej z fosfatydyloinozytolodwufosforanu dwuacyloglicerol aktywujący kinazę białkową C, ta zaś zapoczątkowuje syntezę pochodnych kwasu arachidonowego zależnych od cytochromu P450 [43, 52, 94]. Długotrwałe działanie dopaminy w PCT wymaga jednoczesnego pobudzenia kinaz białkowych C i A [94]. Ostatnio pojawiło się doniesienie [91], że aktywacja receptorów  $\text{DA}_2$  w tej części nefronu powoduje wzrost aktywności  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPazy prawdopodobnie w wyniku zmniejszenia stężenia cAMP w komórce.

W mTAL [59, 71] i CCD [52, 60] dopamina zmniejsza aktywność  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPazy w wyniku działania wyłącznie na receptory  $\text{DA}_1$  związane z cyklazą adenylową. W działaniu dopaminy w mTAL [52, 71, 77] i CCD [32, 52, 60, 89] uczestniczy cykliczny AMP i kinaza białkowa A. W ramieniu wstępującym pętli Henlego dopamina może stymulować fosforylowanie endogennego inhibitora fosfataz białkowych DARPP-32 przez kinazę białkową A (Ryc. 1). Wykazano, że agonista receptorów  $\text{DA}_1$  fenoldopam zmniejsza aktywność fosfatazy białkowej typu 1 w tej części nefronu [95]. Innym mechanizmem działania dopaminy może być indukowanie przez wspomnianą kinazę syntezy pochodnych kwasu arachidonowego zależnych od cytochromu P450 [52], co wykazano w korowej części kanalików zbiorczych [32, 60].

Antagonistyczne do dopaminy działanie ma norad-



renalina uwalniana przez zakończenia neuronów współczulnych — zwiększa ona aktywność  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPazy w kanaliku proksymalnym [96, 97]. Noradrenalina zwiększa powinowactwo enzymu do sodu bez wpływu na  $V_{\max}$  [83, 98]. Podobnie jak w wypadku dopaminy, sprzeczne są dane dotyczące receptorów odpowiedzialnych za działanie noradrenaliny. Według Aperia i wsp [83] konieczne jest pobudzenie receptorów  $\alpha_1$  i  $\alpha_2$ , według innych doniesień [99] wyłącznie receptorów  $\alpha_1$ . Mechanizm działania noradrenaliny polega prawdopodobnie na zwiększaniu wewnątrzkomórkowego stężenia wapnia, który aktywuje fosfatazę białkową typu 2b (kalcyneurynę) [83, 84, 98].

Pobudzenie receptora  $\alpha_2$  w kanalikach krętych dystalnych zwiększa wrażliwe na ouabainę wychwytywanie rubidu [100]. W działaniu tym pośredniczy fosfolipaza C i kinaza białkowa C [101].

Istnieją dane wskazujące, że komórki kanalików nerkowych mogą zawierać także receptory adrenergiczne  $\beta$ . Pobudzenie tych receptorów prowadzi do wzrostu aktywności  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPazy w kanaliku proksymalnym [102] oraz do jej spadku w korowej części kanalików zbiorczych [62].

### III-2. Angiotensyna

Angiotensyna II stosowana zarówno *in vivo* [103] jak i *in vitro* [59, 98, 104] zwiększa powinowactwo  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPazy do sodu w kanaliku proksymalnym nie wpływając na aktywność maksymalną. Mechanizm działania polega na zwiększeniu stężenia  $\text{Ca}^{2+}$  w komórce i aktywacji fosfatazy typu 2b [98]. Istnieją dane, że w większych stężeniach angiotensyna może wywierać przeciwne (natriuretyczne) działanie. Poprzez receptory znajdujące się w błonie luminalnej komórki pobudza ona fosfolipazę  $A_2$  i powoduje uwalnianie 5,6-EET będącego inhibitorem  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPazy [41, 42, 105, 106]. Angiotensyna II wzmacnia też uwalnianie innych pochodnych kwasu arachidonowego zależnych od cytochromu P450: 16<sup>-</sup>, 17<sup>-</sup>, 18<sup>-</sup>, 19<sup>-</sup> i 20-HETE [45].

Podobne działanie ma inny peptyd należący do układu renina-angiotensyna-aldosteron: angiotensyna (1-7). Zmniejsza ona zależne od ATPazy zużycie tlenu przez komórki PCT szczura [107]. Mechanizm jej działania nie jest znany, wiadomo jednak, że aktywuje ona fosfolipazę  $A_2$  w tych komórkach [108] co sugeruje, że może działać poprzez pochodne kwasu arachidonowego. Angiotensyna (1-7) jest głównym metabolitem angiotensyny II w nerkach, może też powstawać bezpośrednio z angiotensyny I, zwłaszcza po zablokowaniu enzymu konwertującego [107].

### III-3. Peptydy natriuretyczne

Kardiomiocyty przedsionków serca syntetyzują i wydzielają do krwi 4 pochodzące od wspólnego prekursora peptydy natriuretyczne: ANP<sub>99-126</sub> (przed-

sionkowy czynnik natriuretyczny, ANF), ANP<sub>1-30</sub> (długo działający peptyd natriuretyczny), ANP<sub>31-67</sub> (peptyd rozszerzający naczynia) i ANP<sub>79-98</sub> (peptyd kaliuretyczny). Bodźcem do wydzielania peptydów przedsionkowych jest rozciągnięcie ściany przedsionka. Działają one na tkanki za pośrednictwem receptorów zawierających błonową cyklazę guanylową [praca przeglądowa — 109]. Wszystkie te peptydy znacznie zwiększają wydalanie sodu z moczem, przy czym działanie to wynika z hamowania jego transportu w różnych odcinkach nefronu, zwłaszcza w części rdzennej kanalików zbiorczych [16].

ANF zmniejsza wrażliwe na ouabainę zużycie tlenu przez komórki IMCD [110]. Badania wykonywane zarówno *in vitro* [78] jak i *in vivo* [73] wykazały, że hormon ten zmniejsza  $V_{\max}$   $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPazy w części rdzennej nerek. W działaniu tym pośredniczy cGMP i kinaza białkowa G [61, 73, 78]. ANF zmniejsza też aktywność  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPazy w PCT, ale tylko wówczas, gdy została ona uprzednio pobudzona przez angiotensynę lub noradrenalinę [98].

ANP<sub>31-67</sub> zmniejsza  $V_{\max}$   $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPazy w komórkach IMCD. W jego działaniu pośredniczy prostaglandyna  $E_2$ , nie bierze natomiast udziału cGMP [111]. Wykazano również, że ANP<sub>1-30</sub>, ANP<sub>31-67</sub> i ANP<sub>79-98</sub> hamują  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPazę w korze i rdzeniu nerek w preparatach bezkomórkowych, także przy udziale PGE<sub>2</sub> [33, 34].

### III-4. Tlenek azotu

Tlenek azotu (NO) jest ważnym wewnątrznerkowym regulatorem natriurezy. Jest on wytwarzany przez syntazę tlenu azotu znajdującą się w komórkach kanalików nerkowych [112-114]. NO ma działanie natriuretyczne, w kanaliku proksymalnym hamuje zarówno napływ sodu do komórki, jak i  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPazę [115, 116]. Zmniejsza on również aktywność  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPazy w części rdzennej nerek [77, 78], a także w izolowanych komórkach IMCD [61]. Tlenek azotu aktywuje cytoplazmatyczną cyklazę guanylową. W jego działaniu na  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPazę bierze udział cGMP i kinaza białkowa G [77, 78]. W działaniu NO może też uczestniczyć mechanizm niezależny od cGMP; nadtlenoazotyn (ONOO<sup>-</sup>) powstający w wyniku reakcji NO z anionorodnikiem ponadtlenkowym jako silnie reaktywny wolny rodnik może uszkadzać lipidy błonowe i w ten sposób zmniejszać aktywność  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPazy [115].

### III-5. Parathormon

Parathormon (PTH) hamuje transport sodu w kanaliku proksymalnym. Efekt ten jest wynikiem hamowania zarówno wymiennicza  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  w błonie luminalnej komórki [117] jak i hamowania  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPazy [118]. Receptory dla PTH w tym odcinku nefronu aktywują fosfolipazę C i cyklazę adenylową [119].

Krótkotrwałe działanie parathormonu jest wynikiem pobudzenia szlaku fosfolipaza C — diacyloglicerol — kinaza białkowa C — pochodne kwasu arachidonowego zależne od cytochromu P450 [42, 43, 52]. Natomiast długotrwałe hamowanie  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPazy przez PTH wymaga jednoczesnej aktywacji kinaz białkowych C i A [94].

### III-6. Hormony sterydowe kory nadnerczy

Istotne znaczenie w regulacji  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPazy mają mineralo- i glukokortykoidy. Aldosteron wzmacnia kanalikowy transport sodu stymulując zarówno napływ tego kationu do komórki, jak i aktywność  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPazy [120]. U zwierząt po adrenalectomii aktywność  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPazy spada szczególnie w korowej części kanalików zbiorczych [121], w mniejszym stopniu w PCT, mTAL i DCT [122]. Spadek ten jest wynikiem zmniejszonej syntezy enzymu, co przejawia się obniżeniem poziomu mRNA podjednostek  $\alpha 1$  i  $\beta 1$  w komórkach CCD [123, 124]. Podanie aldosteronu w dawce substytucyjnej przywraca aktywność  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPazy do normy [121, 125, 126]. Podawanie syntetycznych mineralokortykoidów zwierzętom z zachowanymi nadnerczami także zwiększa aktywność  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPazy w kanalikach dystalnych i zbiorczych [127-129]. Zmiany aktywności  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPazy w CCD pod wpływem niedoboru lub nadmiaru aldosteronu są niezależne od towarzyszących tym stanom zaburzeń gospodarki potasowej [130]. Aldosteron aktywuje też  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPazę w izolowanych CCD *in vitro* [131].

Aldosteron pobudza syntezę  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPazy. Hormon ten zwiększa ilość mRNA podjednostek  $\alpha 1$  i  $\beta 1$ , czemu zapobiegają inhibitory transkrypcji [132-134] oraz ilość cząsteczek enzymu w błonie komórkowej [135, 136]. Aldosteron wpływa też na syntezę cząsteczek  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPazy znajdujących się w „puli rezerwowej”, które mogą ulegać rekrutacji do błony komórkowej pod wpływem zwiększonego napływu sodu [18, 21]. Większość danych doświadczalnych wskazuje, że wpływ aldosteronu na biosyntezę  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPazy nie wynika ze zwiększonego napływu sodu do komórki, ale z bezpośredniego działania tego hormonu na ekspresję genów podjednostek  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPazy [133, 136, 137].

Również naturalne i syntetyczne glukokortykoidy zwiększają aktywność  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPazy zarówno *in vivo*, jak i *in vitro* w różnych częściach nefronu, ich działanie także zależy od pobudzenia transkrypcji i syntezy białka *de novo* [133, 134, 136, 138, 139]. W przeciwieństwie do aldosteronu, działanie glukokortykoidów jest wynikiem zwiększonego napływu sodu do komórki [136].

Glukokortykoidy mają powinowactwo zarówno do receptorów gliko- jak i mineralosterydowych. Największa ilość tych ostatnich znajduje się w kanaliku dystalnym i części korowej kanalików zbiorczych [2].

W tych odcinkach nefronu glikokortykosterydy mogą działać za pośrednictwem receptorów mineralosterydowych. Wzrost aktywności  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPazy pod wpływem deksametazonu w komórkach CCD może być zablokowany przez spironolakton, antagonistę receptorów mineralosterydowych [140]. Działanie naturalnych glukokortykoidów w częściach nefronu zawierających dużo receptorów mineralosterydowych jest jednak słabsze, komórki te zawierają bowiem dehydrogenazę 11-betahydroksysterydową (11- $\beta$ OHSD), która powoduje unieczynnienie tych hormonów chroniąc w ten sposób receptory mineralosterydowe przed działaniem glukokortykoidów [16, 141]. Zahamowanie tego enzymu wzmacnia wzrost aktywności  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPazy pod wpływem deksametazonu i kortykosteronu w hodowli komórek nabłonka nerki szczura [133]. U szczurów po adrenalectomii kortykosteron przywraca prawidłową aktywność  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPazy w CCD tylko wówczas, jeśli podawano im jednocześnie inhibitor 11- $\beta$ OHSD — karbenoksolon [142]. Działanie glikosterydów w pozostałych częściach nefronu, odbywa się za pośrednictwem receptorów glikosterydowych [136, 140].

Wzrost aktywności  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPazy pod wpływem glukokortykoidów nie jest wynikiem hamowania przez te hormony syntezy prostaglandyn [136].

### III-7. Insulina

Insulina aktywuje transport sodu i wrażliwe na ouabainę wychwytywanie znakowanego rubidu w PCT, mMTAL, CTAL, CCD, OMCD i IMCD [15]. W kanalikach proksymalnych hormon ten zwiększa powinowactwo  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPazy do sodu nie wpływając na  $V_{\max}$  [12]. Mechanizm działania insuliny polega prawdopodobnie na fosforylowaniu podjednostki  $\alpha$   $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPazy przez kinazę tyrozynową [82]. Natomiast w kanalikach zbiorczych insulina zwiększa  $V_{\max}$ , a nie wpływa na powinowactwo  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPazy do sodu [14].

Peptyd C zwiększa  $V_{\max}$   $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPazy w kanalikach proksymalnych. Mechanizm jego działania polega na zwiększaniu za pośrednictwem białka G dokomórkowego napływu  $\text{Ca}^{2+}$ , który aktywuje fosfatazę białkową typu 2b [143].

### III-8. Hormony tarczycy

Niedoczynność tarczycy charakteryzuje się spadkiem aktywności  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPazy w PCT, mTAL, CTAL i CCD zarówno u szczurów [144], jak i u królików [145]. Jest to wynikiem zmniejszenia ilości enzymu w błonie komórkowej [145]. Podobnie tyroksyny lub trójiodotyroniny zwierzętom z usuniętą tarczycą przywraca aktywność  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPazy do normalnego poziomu [144, 145]. Hormony tarczycy zwiększają ilość mRNA podjednostek  $\alpha$  i  $\beta$  oraz samych podjednostek w korze nerek [146, 147]. Także *in vitro* trójiodotyronina zwiększa aktywność  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPazy, ilość podjednostek  $\alpha$  i  $\beta$  w błonie komórkowej oraz mRNA tych podjednostek w komór-

kach kanalików proksymalnych [148]. Nie wyjaśniono, czy hormony tarczycy bezpośrednio wpływają na ekspresję genów  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPazy, czy też ich działanie jest wynikiem zwiększonego napływu sodu do komórki. Hormony te zwiększają bowiem aktywność wymiennicza  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  w kanalikach proksymalnych [149].

### III-9. Inne mediatory

Interleukina 1 (IL-1) hamuje wchłanianie zwrotne sodu w części rdzennej wewnętrznej kanalików zbiorczych [150]. Wykazano, że IL-1 zmniejsza wrażliwość na ouabainę wychwytywanie  $^{86}\text{Rb}^+$  w komórkach IMCD. W działaniu tej cytokiny pośredniczy prostaglandyna  $\text{E}_2$  [151].

Endotelina 1 (ET-1) — peptyd syntetyzowany przez komórki śródbłonna zmniejsza aktywność  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPazy w kanalikach proksymalnych [152]. ET-1 zmniejsza też wrażliwość na ouabainę zużycie tlenu i wychwytywanie  $^{86}\text{Rb}^+$  w komórkach części rdzennej wewnętrznej kanalików zbiorczych [153]. W działaniu endoteliny w tym odcinku nefronu pośredniczy  $\text{PGE}_2$  [153]. Fakt, że ET-1 jest produkowana w kanalikach zbiorczych, w których znajdują się też receptory dla tego peptydu wskazuje na istotną rolę endoteliny jako auto- lub parakrynnego regulatora natriurezy [16, 154].

Czynnik wzrostu naskórka (EGF) jest syntetyzowany w PCT, mTAL, CTAL i DCT. Wykazuje on działanie natriuretyczne *in vivo*, hamuje też transport sodu przez izolowane perfundowane CCD [155]. Komórki części rdzennej kanalików zbiorczych zawierają receptory dla EGF [16, 82]. EGF stymuluje syntezę  $\text{PGE}_2$  w tej części nefronu [156]. Natomiast w kanalikach proksymalnych, EGF wzmacnia reabsorpcję sodu [157] i wychwytywanie znakowanego rubidu [82].

Neuropeptyd Y (NPY) jest wydzielany wraz z noradrenaliną przez zakończenia neuronów współczulnych. Zwiększa on aktywność  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPazy w kanalikach proksymalnych [158]. Jego działanie na  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPazę wynika z pobudzenia za pośrednictwem receptorów  $\text{Y}_2$  napływu wapnia do komórki [84, 159].

#### CZYNNIKI POBUDZAJĄCE $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPazę

Noradrenalina  
Neuropeptyd Y  
Angiotensyna II  
Aldosteron  
Glukokortykoidy  
Hormony tarczycy  
Insulina

#### CZYNNIKI HAMUJĄCE $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPazę

Peptydy natriuretyczne  
Tlenek azotu  
Prostaglandyna  $\text{E}_2$   
Pochodne kwasu arachidonowego  
zależne od cytochromu P450  
Dopamina  
Parathormon

SPADEK  
NATRIUREZY

$\text{Na}^+, \text{K}^+$   
-ATPaza

WZROST  
NATRIUREZY

Ryc. 2. Najważniejsze hormony i mediatory wpływające na aktywność  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPazy w kanalikach nerkowych.

## IV. Podsumowanie

Aktywność  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPazy w kanalikach nerkowych jest efektem działania wielu mechanizmów humoralnych wewnątrz- i pozanerkowych (Ryc. 2). Czynniki aktywujące  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPazę hamują wydalanie sodu z moczem, natomiast czynniki zmniejszające aktywność enzymu mają działanie natriuretyczne. Wzajemna równowaga tych dwóch grup mediatorów zapewnia sprawną kontrolę bilansu sodowego i objętości płynów ustrojowych.

Artykuł otrzymano 22 stycznia 1998 r.

Zaakceptowano do druku 10 sierpnia 1998 r.

## Piśmiennictwo

1. Leśniak W, Porębska Z (1992) ATPazy. Budowa i funkcje, Polskie Towarzystwo Biochemiczne, Warszawa
2. Jørgensen PL (1986) *Kidney Int* 29: 10-20
3. Doucet A (1988) *Kidney Int.* 34: 749-760
4. Katz AI (1982) *Am J. Physiol* 242: F207-F219
5. Clapp WL, Bowman P, Shaw GS, Patel P, Kone BC (1994) *Kidney Int* 46: 627-38
6. Lücking K, Nielsen JM, Pedersen PA, Jørgensen PL (1996) *Am J Physiol* 271: F253-F260
7. Doucet A, Barlet C (1986) *J Biol Chem* 261: 993-995
8. Barlet-Bas C, Arystarkhova EA, Cheval L, Marsy S, Sweadner KJ, Modyanov NN, Doucet A (1993) *J Biol Chem* 268: 11512-11515
9. Féraille E, Barlet-Bas C, Cheval L, Rousselot M, Carranza ML, Dreher D, Arystarkhova EA, Doucet A (1995) *Pflügers Arch* 430: 205-212
10. Doucet A, Katz AI, Morel F (1979) *Am J Physiol* 237: F105-F113
11. Ewart HS, Klip A (1995) *Am J Physiol* 269: C295-C311
12. Féraille E, Carranza ML, Rousselot M, Favre H (1994) *Am J Physiol* 267: F55-F62
13. Féraille E, Carranza ML, Buffin-Meyer B (1995) *Am J Physiol* 268: C1277-C1283
14. Féraille E, Rousselot M, Rajerison R, Favre H (1995) *Am J Physiol* 488: 171-180
15. Féraille E, Marsy S, Cheval L, Barlet-Bas C, Khadouri C, Favre H, Doucet A (1992) *Am J Physiol* 263: F173-F179
16. Zeidel ML (1993) *Am J Physiol* 265: F159-F173
17. Barlet-Bas C, Cheval L, Khadouri C, Marsy S, Doucet A (1990) *Am J Physiol* 259: F246-F250
18. Barlet-Bas C, Khadouri C, Marsy S, Doucet A (1990) *J Biol Chem* 265: 7799-7803
19. Rokaw MD, Sarac E, Lechman E, West M, Angewski J, Johnson JP, Zeidel ML (1996) *Am J Physiol* 270: C600-C607
20. Coutry N, Blot-Chabaud M, Mateo P, Bonvalet JP, Farman N (1992) *Am J Physiol* 263: C61-C68
21. Blot-Chabaud M, Wonstok F, Bonvalet JP, Farman N (1990) *J Biol Chem* 265: 11676-11681
22. Bonvalet JP, Pradelles P, Farman N (1987) *Am J Physiol* 253: F377-387
23. Schlondorff D, Satriano A, Schwartz GJ (1985) *Am J Physiol* 248: F134-F144
24. Iino Y, Imai M (1978) *Pflügers Arch.* 373: 125-132
25. Jabs K, Zeidel ML, Silva P (1989) *Am J Physiol* 257: F424-F430
26. Wald H, Scherner P, Rubinger D, Papovtner MM (1990) *Pflügers Arch* 415: 648-650
27. Scherzer P, Wald H, Rubinger D, Popovtner MM (1992) *Clin Sci* 83: 307-311
28. Cordova HR, Kokko JP, Marver D (1989) *Am J Physiol* 256: F570-F576
29. Lear S, Silva P, Kelley VE, Epstein FH (1990) *Am J Physiol* 258: F1372-F1378

30. Strange K (1991) *Am J Physiol* **260**: F225-F234
31. Warden DH, Stokes JB (1991) *Clin Res* **39**: 192
32. Satoh T, Cohen HT, Katz AI (1993) *J Clin Invest* **91**: 409-415
33. Chiou S, Vesely DL (1995) *Life Sci* **57**: 945-955
34. Chiou S, Vesely DL (1995) *Endocrinology* **136**: 2033-2039
35. Marver D, Bernabe J (1992) *J Am Soc Nephrol* **3**: 500
36. Cohen-Luria R, Rimon G, Moran A (1993) *Am J Physiol* **264**: F61-F65
37. Warden DH, Stokes JB (1993) *Am J Physiol* **264**: F67-F677
38. Carrol MA, Balazy M, McGiff JC (1993) *J Physiol Pharmacol* **44** (Suppl 2) 37-49
39. Capdevila JH, Falck JR, Estabrook RW (1992) *FASEB J* **6**: 731-736
40. Capdevila J, Wei S, Yan J, Karara A, Jacobson HR, Falck JR, Guengerich P, DuBois RN (1992) *J Biol Chem* **267**: 21720-21726
41. Romero MF, Hopfer U, Madhun ZT, Zhou W, Douglas JG (1991) *Ren Physiol Biochem* **14**: 199-207
42. Ribeiro CP, Dubay GR, Falck JR, Mandel LJ (1994) *Am J Physiol* **266**: F497-F505
43. Ominato M, Satoh T, Katz AI (1996) *J Membr Biol* **152**: 235-243
44. Nowicki S, Chen SL, Aizman O, Cheng XJ, Li D, Nowicki C, Nairn A, Greengard P, Aperia A (1997) *J Clin Invest* **99**: 1224-1230
45. Carrol MA, Balazy M, Margutta P (1996) *Am J Physiol* **271**: R863-R869
46. Escalante B, Erlij D, Falck JR, McGiff JC (1991) *Science* **251**: 799-802
47. Escalante B, Erlij D, Falck JR, McGiff JC (1994) *Am J Physiol* **266**: C1775-C1782
48. Schwartzman M, Ferreri NR, Carroll MA, Songu-Mize E, McGiff JC (1985) *Nature (Lond)* **314**: 620-622
49. Carrol MA, Sala A, Dunn CA, McGiff JC, Murphy RC (1991) *J Biol Chem* **266**: 12306-12312
50. Escalante B, Falck JR, Yadagiri P, Sun L, Laniado-Schwartzmann M (1988) *Biochem Biophys Res Commun* **152**: 1269-1274
51. Bertorello A, Aperia A (1989) *Am J Physiol* **256**: F370-F373
52. Satoh T, Cohen HT, Katz AI (1993) *Am J Physiol* **265**: 399-405
53. Bertorello AM (1992) *J Cell Sci* **101**: 343-347
54. Breton S, Beck JS, Laprade R (1994) *Am J Physiol* **266**: F400-F410
55. Beck JS, Marsolais M, Noël J, Breton S, Laprade E (1995) *Ren Physiol Biochem* **18**: 21-26
56. Bertorello A, Aperia A (1990) *Am J Physiol* **259**: F924-F928
57. Silva P, Koenig B, Lear S, Eveloff J, Kinne R (1987) *Pflügers Arch* **409**: 74-80
58. Fryckstedt J, Aperia A (1992) *Acta Physiol Scand* **144**: 185-190
59. Aperia A, Fryckstedt J, Svensson L, Hemmings HC, Nairn AC, Greengard P (1991) *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 2798-2800
60. Satoh T, Cohen HT, Katz AI (1992) *J Clin Invest* **89**: 1496-1500
61. Zeidel ML, Silva P, Brenner BM, Seifter JL (1987) *Am J Physiol* **252**: F550-F559
62. Bertorello AM, Katz AI (1993) *Am J Physiol* **265**: F743-F755
63. Bertorello AM, Aperia A, Walaas SI, Nairn AC, Greengard PS (1991) *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 11359-11363
64. Chibalin AV, Vasilets LA, Hennekes H, Pralong D, Geering K (1992) *J Biol Chem* **267**: 22378-22384
65. Logvinenko NS, Dulubowa I, Fedosowa N, Larsson SH, Nairn AC, Esmann M, Greengard P, Aperia A (1996) *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 9132-9137
66. Middleton JP, Khan WA, Collinsworth G, Hannun YA, Medford RM (1993) *J Biol Chem* **258**: 15958-15964
67. Shahedi M, Laborde K, Bassieres L, Dechaux M, Sachs C (1992) *Pflügers Arch* **420**: 269-274
68. Parker J, Daniel LW, Waite M (1987) *J Biol Chem* **262**: 5385-5393
69. Żylińska L, Lachowicz L (1995) *Post Biochem* **41**: 276-282
70. Li D, Aperia A, Celsi G, da Cruz EF, Greengard P, Meister B (1995) *Am J Physiol* **269**: F673-F680
71. Meister B, Fryckstedt J, Schalling M, Cortés R, Hökfelt T, Aperia A, Hemmings HC, Nairn AC, Ehrlich M, Greengard P (1989) *Proc Natl Acad Sci USA* **86**: 8068-8072
72. Fryckstedt J, Snyder G, Aperia A, Meister B (1993) *Kidney Int* **44**: 495-502
73. Bełtowski J, Górny D, Marciniak A (1998) *J Physiol Pharmacol* **49**: 271-283
74. Carranza ML, Feraille E, Favre H (1996) *Am J Physiol* **271**: C136-C143
75. Pedemonte CH, Pressley TA, Lokhandwala MF, Cinelli AR (1997) *J Membr Biol* **155**: 219-227
76. Carranza ML, Feraille E, Kiroytcheva M, Rousselot M, Favre H (1996) *FEBS Lett* **396**: 309-314
77. McKee M, Scavone C, Nathanson JA (1994) *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 12056-12060
78. Scavone C, Scanlon C, McKee M, Nathanson JA (1995) *J Pharmacol Exp Ther* **272**: 1036-1043
79. Snyder GR, Girault JA, Chen YJC, Czernik AJ, Kebebian JW, Nathanson JA, Greengard P (1995) *J Neurosci* **12**: 3071-3083
80. Tsou K, Snyder GL, Greengard P (1993) *Proc Natl Acad Sci USA* **90**: 3462-3465
81. Bełtowski J, Górny D, Marciniak A (1996) *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* **55** (Suppl 1): P232
82. Féraille E, Carranza ML, Rousselot M, Favre H (1997) *J Physiol* **498**: 99-108
83. Aperia A, Ibarra F, Svensson LB, Klee C, Greengard P (1992) *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 7394-7397
84. Ohtomo Y, Ono S, Sahlgren B, Aperia A (1996) *Pediatr Res* **39**: 534-538
85. Tumlin JA, Someren JT, Swanson CE, Lea JP (1995) *Am J Physiol* **269**: F558-F563
86. Lea JP, Sands JM, McMahon SJ, Tumlin JA (1994) *Kidney Int* **46**: 647-652
87. Lokhandwala MF, Amenta F (1991) *FASEB J* **5**: 3023-3030
88. Aperia A, Bertorello A, Seri I (1987) *Am J Physiol* **252**: F39-F45
89. Takemoto F, Cohen HT, Satoh T, Katz AI (1992) *Pflügers Arch* **421**: 302-306
90. Felder CC, Blecher M, Jose PA (1989) *J Biol Chem* **264**: 8739-8745
91. Hussain T, Abdul-Wahab R, Lokhandwala MF (1997) *Eur J Pharmacol* **321**: 259-263
92. Chen C, Lokhandwala MF (1993) *Naunyn-Schmiedeberg Arch Pharmacol* **347**: 289-295
93. Bertorello A, Aperia A (1989) *Am J Physiol* **256**: F57-F62
94. Pinto-do-O PC, Chibalin AV, Katz AI, Soares-da-Silva P, Bertorello AM (1997) *Clin Exp Hypertens* **19**: 73-86
95. Slobodyansky E, Aoki Y, Gaznabi AK, Aviles DH, Fildes RD, Jose PA (1995) *Am J Physiol* **268**: F279-F284
96. Jacobs WR, Chan YL (1987) *Life Sci* **40**: 1571-1578
97. Beach RE, Schwab SJ, Brazy PC, Dennis VW (1987) *Am J Physiol* **252**: F215-F220
98. Aperia A, Holtbäck U, Syrén ML, Svensson LB, Fryckstedt J, Greengard P (1994) *FASEB J* **8**: 436-439
99. Gopalakrishnan SM, Chen C, Lokhandwala MF (1995) *Eur J Physiol* **288**: 139-147
100. Gesek FA (1993) *Am J Physiol* **265**: F561-F568
101. Gesek FA (1996) *Mol Pharmacol* **50**: 407-414
102. Singh H, Linas SL (1997) *Am J Physiol* **273**: F193-F199
103. Brown G, Douglas J (1989) *Arch Biochem Biophys* **275**: 236-243
104. Garvin JL (1991) *J Am Soc Nephrol* **1**: 1146-1152
105. Douglas JG, Hopfer U (1994) *Annu Rev Physiol* **56**: 649-669
106. Houillier P, Chambrey R, Achard JM, Frois-

- sart M, Poggioli J, Paillard M (1996) *Kidney Int* 50: 1496-505
107. Handa RK, Ferrario CM, Strandhoy JW (1996) *Am J Physiol* 270: F141-F147
  108. Leyen SA, Romero MF, Khosla MC, Douglas JG (1993) *Kidney Int* 44: 932-936
  109. Beltowski J (1996) *Post Nauk Med.* 9: 279-288
  110. Zeidel ML, Seifter JL, Lear S, Brenner BM, Silva P (1986) *Am J Physiol* 251: F379-F383
  111. Gunning ME, Bredy HR, Otuechere G, Brenner BM, Zeidel ML (1992) *J Clin Invest* 89: 413-417
  112. Morrissey J, McCracken JR, Kaneto H, Vehaskari M, Montani D, Kluhr S (1994) *Kidney Int* 45: 998-1005
  113. Markewitz BA, Michael JR, Kohan DE (1993) *J Clin Invest* 91: 659-665
  114. Terada Y, Tomita K, Nonoguchi H, Marumo F (1992) *J Clin Invest* 90: 659-665
  115. Guzman NJ, Fang MZ, Tang SS, Ingelfinger JR, Garg LC (1995) *J Clin Invest* 95: 2083-2088
  116. Stoos BA, Garvin JL (1997) *Clin Exp Pharmacol Physiol* 24: 591-594
  117. Gesek FA, Schoolwerth AC (1990) *Am J Physiol* 258: F514-F521
  118. Ribeiro CP, Mandel LJ (1992) *Am J Physiol* 262: F209-F216
  119. Dunlay R, Hruska K (1990) *Am J Physiol* 258: F223-F231
  120. Garty H (1986) *J Membr Biol* 90: 193-205
  121. Petty KJ, Kokko JP, Marver D (1981) *J Clin Invest* 68: 1514-1521
  122. Garg LC, Narang N, Wingo CS (1985) *Am J Physiol* 248: F487-F491
  123. Farman N, Coutry N, Logvinenko N, Blot-Chabaud M, Bourbouze R, Bonvalet JP (1992) *Am J Physiol* 263: C810-C817
  124. Tsuchiya K, Giebisch G, Welling PA (1996) *Am J Physiol* 271: F7-F15
  125. El Mernissi GE, Doucet A (1984) *Pflügers Arch* 399: 139-146
  126. Mujais SK, Chekal MA, Jones WJ, Hayslett JP, Katz AI (1984) *J Clin Invest* 73: 13-19
  127. Terada Y, Knepper MA (1989) *Am J Physiol* 256: F218-F223
  128. Garg LC, Knepper MA, Burg MB (1981) *Am J Physiol* 240: F536-F544
  129. Hayhurst RA, O'Neil RG (1988) *Am J Physiol* 254: F689-F696
  130. Eiam-Ong S, Kurtzman NA, Sabatini S (1993) *J Clin Invest* 91: 2385-2392
  131. Fujii Y, Takemoto F, Katz AI (1990) *Am J Physiol* 259: F40-F45
  132. Verrey F, Kraehenbuhl JP, Rossier BC (1989) *Mol Endocrinol* 3: 1369-1376
  133. Whorwood CB, Ricketts ML, Stewart PM (1994) *Endocrinology* 133: 901-910
  134. Whorwood CB, Stewart PM (1995) *J Mol Endocrinol* 15: 93-103
  135. Welling PA, Caplan M, Sutters M, Giebisch G (1993) *J Biol Chem* 268: 23469-23476
  136. Laplace JR, Husted RF, Stokes JB (1992) *J Clin Invest* 90: 1370-1378
  137. Barlet-Bas C, Doucet A (1988) *Prog Clin Biol Res* 268B: 339-344
  138. Doucet A, Hus-Citharel A, Morel P (1986) *Am J Physiol* 251: F851-F857
  139. Wang ZM, Yasui M, Celsi G (1994) *Am J Physiol* 267: C450-C455
  140. El Mernissi G, Doucet A (1983) *Pflügers Arch* 399: 147-151
  141. Benediktsson R, Walker BR, Edwards CR (1995) *Curr Opin Nephrol Hypertens* 4: 41-46
  142. Tsuganezawa H, Hayashi M, Fujii Y, Yamaji Y, Iyori M, Saruta T (1995) *Ren Physiol Biochem* 18: 66-72
  143. Ohtomo Y, Aperia A, Suhlgrén B, Johanson BL, Wahren J (1996) *Diabetologia* 39: 199-205
  144. Garg LC, Tisher CC (1985) *J Lab Clin Med* 106: 568-572
  145. Barlet C, Abdelkhalik M, Doucet A (1985) *Pflügers Arch* 405: 52-57
  146. Chaudhury S, Ismail-Beigi F, Gick GG, Lefenson R, Edelman JS (1987) *Mol Endocrinol* 1: 83-89
  147. Mc Donough AA, Brown TA, Horowitz BB, Chiu R, Schlöterbeck J, Bowen J, Schmitt CA (1988) *Am J Physiol* 254: C323-C329
  148. Lin HH, Tang MJ (1997) *Life Sci* 60: 375-382
  149. Beers KW, Dousa TP (1993) *Am J Physiol* 265: F323-F326
  150. Kohan DE, Meril CA, Simon EE (1989) *Am J Physiol* 256: F810-F813
  151. Zeidel ML, Brady HR, Kohan DE (1991) *Am J Physiol* 261: F1013-F1016
  152. Garvin J, Sanders K (1991) *J Am Soc Nephrol* 2: 976-982
  153. Zeidel ML, Brady HR, Kone BC, Gullans SR, Brenner BM (1989) *Am J Physiol* 257: C1101-C1107
  154. Kohan DE, Padilla E, Hughes AK (1993) *Am J Physiol* 265: F670-F676
  155. Vehaskari VM, Herndon J, Hamm LL (1991) *Am J Physiol* 261: F896-F903
  156. Harris RC (1989) *Am J Physiol* 256: F117-F1124
  157. Qugley R, Baum M (1994) *Am J Physiol* 266: F459-F465
  158. Ohtomo Y, Meister B, Hökfelt T, Aperia A (1994) *Kidney Int* 45: 1606-1613
  159. Ohtomo Y, Ono S, Zettegren E, Sahlgrén B (1996) *Acta Physiol Scand* 158: 97-105



## Do członków Polskiego Towarzystwa Biochemicznego

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

# Fosfatydyloseryna u *Prokaryota* i *Eukaryota*. Dekarboksylacja, synteza i transport

## Phosphatidylserine in *Prokaryota* and *Eukaryota*. Decarboxylation, synthesis and transport

ANNA DYGAS\*

### Spis treści:

- I. Wstęp — rola dekarboksylazy fosfatydyloseryny
- II. Przemiany fosfatydyloseryny i produktu jej dekarboksylacji — fosfatydyloetanolaminy
  - II-1. Synteza fosfatydyloseryny
  - II-2. Dekarboksylacja fosfatydyloseryny
  - II-3. Metylacja fosfatydyloetanolaminy
- III. Lokalizacja enzymów metabolizmu fosfatydyloseryny
- IV. Transport substratu i produktu dekarboksylazy fosfatydyloseryny
- V. Regulacja syntezy i dekarboksylacji fosfatydyloseryny

**Wykaz stosowanych skrótów:** PS — fosfatydyloseryna; PE — fosfatydyloetanolamina; PC — fosfatydylocholina; CDP-DAG — cytydynodifosforan diacylo-1,2-*sn*-glicerolu; PG — fosfatydyloglicerol; PGP — fosfatydyloglicerofosforan; CL — kardiolipina; Pyr<sub>x</sub>PS — 1-palmitoilo-2(1-pyrenyloacylo)<sub>x</sub>-*sn*-glicero-3-fosfoseryna (x — to ilość jednostek węglowych w łańcuchu alifatycznym łącznie z węglem karbonylowym); NBD-PS — acylo-2 [N-(7-nitrobenzo-2-oksa-1,3-diazol-4-yl)aminoheksanoil]-*sn*-glicero-3-fosfoseryna; NEM — N-etylomaleimid

### I. Wstęp — rola dekarboksylazy fosfatydyloseryny

Dekarboksylaza fosfatydyloseryny [EC.4.1.1.65], enzym przeprowadzający przemianę fosfatydyloseryny (PS) do fosfatydyloetanolaminy (PE), została odkryta w 1961 roku przez Borkenhabena i w s p. [1]. Wiedzano wcześniej, że seryna wbudowywana jest do fosfolipidów w wątrobie szczura [2], i że aminokwas ten nie ulega bezpośredniej dekarboksylacji [3-5]. Dopiero jednak Borkenhaben i w s p. [1] wykazali, że to z PS powstaje produkt jej dekarboksylacji — PE. Od momentu odkrycia reakcji dekarboksylacji PS zbadano, że zachodzi ona w całym świecie żywym, u bakterii, roślin i ssaków, jednak enzym który ją katalizuje został oczyszczony do homogenności tylko z *Escherichii coli*.

\* Dr, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN, Zakład Neurobiologii Molekularnej i Komórkowej, Pracownia Przekazników Sygnałów, ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa

### Contents:

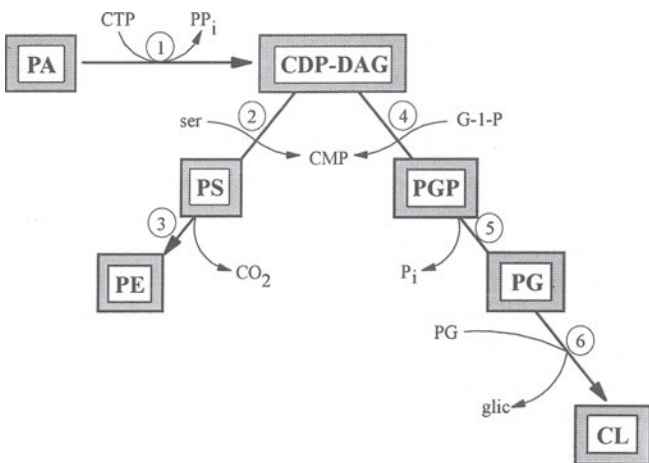
- I. Introduction — the role of phosphatidylserine decarboxylation
- II. Metabolism of phosphatidylserine and phosphatidylethanolamine — the product of its decarboxylation
  - II-1. Phosphatidylserine synthesis
  - II-2. Decarboxylation of phosphatidylserine
  - II-3. Methylation of phosphatidylethanolamine
- III. Localization of the enzymes of phosphatidylserine metabolism
- IV. Transport of phosphatidylserine decarboxylase substrate and product
- V. Regulation of phosphatidylserine synthesis and decarboxylation.

Dekarboksylacja PS dostarcza w komórkach *E. coli* aż 70% wszystkich fosfolipidów. Pomimo to mutanty, które nie zawierają syntazy PS, a produkują tylko fosfatydyloglicerol i kardiolipinę [6] mogą rosnąć, choć tylko w obecności  $Mg^{2+}$  w środowisku. Podobnie jest z mutantami, które nie mają dekarboksylazy PS i produkują w nadmiarze fosfatydyloserynę [7]. Stwierdzono, że mutant nie zawierający PE ma nieaktywną permeazę laktozową [8], w 80% zredukowaną aktywność oksydazy NADH typu II i nie posiada wici. PE wydaje się być niezbędna dla wykazywania przez komórkę ruchliwości i chemotaksji [9]. U drożdży mutanty nie posiadające aktywnych enzymów dekarboksylujących PS (PSD1 i PSD2) są auksotrofami w stosunku do etanolaminy co wyraźnie wskazuje, że rolą PSD u niższych *Eukaryota* jest produkcja PE [10].

W komórkach drożdży pozbawionych genu *PSD1* zaobserwowano niski poziom PE w mitochondriach, co mówi o roli dekarboksylazy w tych organizmach [10]. Natomiast trudno określić przy obecnym stanie wiedzy, czy rolą dekarboksylazy PS znajdującej się w mitochondriach u ssaków jest usuwanie z nich tej PS, która zostanie do nich przetransportowana, czy być może produkcja PE, tak jak u *Prokaryota* i prawdopodobnie niższych *Eukaryota*. Mała ilość PS w mitochondriach, a także brak jak dotychczas dowodów na to, że PE pochodząca z dekarboksylacji PS pozostaje w mitochondriach zdaje się wskazywać głównie na tę pierwszą funkcję zwłaszcza, że *Eukaryota* mają dostęp do PE i produktów jej hydrolizy znajdujących się w pożywieniu. Należy tu dodać, że wewnątrz-

komórkowe stężenie cholicy i etanolaminy nie tylko zależy od ich stężenia we krwi, ale także od czynników regulujących ich transport przez błonę plazmatyczną oraz od szybkości ich zużycia w syntezie fosfatydylocholicy (PC) i PE drogą *de novo* zwanej też od nazwiska jej odkrywcy drogą Kennedy'ego. Wykazano bowiem, że wzrost ilości fosfoetanolaminy i PE produkowanej drogą Kennedy'ego hamuje aktywność dekarboksylazy PS, co wskazuje na wzajemną koordynację tych szlaków [11]. Wykazano też, że synteza PC na drodze metylacji PE powstałej zarówno z dekarboksylacji PS jak i syntezy *de novo* jest niezbędna do normalnego wzrostu i funkcjonowania wątroby u myszy trzymanej na diecie ubogiej w cholinę. Stwierdzono przy tym jednak, że metylacja PE do PC nie może zastąpić *de novo* syntezy PC, ponieważ aktywność enzymu metylującego (PEMT) maleje w czasie podziałów komórki, natomiast wzrasta aktywność transferazy cytydylowej CTP: fosfocholina, enzymu regulatorowego syntezy PC drogą Kennedy'ego [12]. Zupełnie inaczej jest u drożdży. Tam cała PC może pochodzić z metylacji PE — produktu dekarboksylacji PS. Także u nielicznych bakterii, które posiadają w swoim składzie fosfolipidowym PC, syntetyzowana jest ona na drodze metylacji PE — produktu dekarboksylacji PS.

Być może istnieje związek pomiędzy syntezą i dekarboksylacją PS oraz metylacją PE a funkcjami wydzielniczymi wątroby u ssaków. Stwierdzono na przykład, że w syntezie PS u ssaków najbardziej preferowanymi przez enzym substratami lipidowymi są wielonienasycone fosfolipidy. Badania wykazały też, że do prawidłowego rozwoju mózgu u płodu potrzebne są wielonienasycone rodzaje molekularne PE — głównie zawierających kwas tłuszczowy 22:6 [12]. W okresie rozwoju płodowego to wątroba matki produkuje



Ryc. 1. Synteza *de novo* fosfatydyloseryny. (1) — Syntaza CDP-diacyloglicerolu [EC.2.7.7.41]; (2) — Syntaza fosfatydyloseryny [EC.2.7.8.8.]; (3) — Dekarboksylaza fosfatydyloseryny [EC.4.1.1.65]; (4) — Syntaza fosfatydyloglicerofosforanu [EC.2.7.8.5]; (5) — Fosfataza fosfatydyloglicerofosforanu [EC.3.1.3.27]; (6) — Syntaza kardioliptyny; PA — kwas fosfatydowy; PS — fosfatydyloseryna; PE — fosfatydyloetanolamina; CDP-DAG — diacyloglicerol; PGP — fosfatydyloglicerofosforan; PG — fosfatydyloglicerol; CL — kardioliptyna.

znaczne ilości PE i PC, zawierających ten właśnie kwas tłuszczowy [13], jednocześnie stwierdzono, że w wątrobie prenatalnej bardzo niska jest aktywność enzymów metylujących PE. Wzrasta ona dopiero po urodzeniu, tak że dojrzałe komórki wątrobowe mają już wysoką ekspresję aktywności enzymów metylujących PE. Czy istotnie jednak proces metylacji PE, a więc by może także wcześniejszy etap dekarboksylacji PS do PE związane są z procesami wydzielniczymi wątroby — nie wiadomo.

Fosfolipidy, którym przez długie lata przypisywano tylko funkcje strukturalne, prawie wszystkie mogą w błonach plazmatycznych pełnić aktywną rolę w przekazywaniu zewnątrzkomórkowych sygnałów [14]. Po pobudzeniu komórki przez agonistów ulegają one hydrolizie i są źródłem przekaźników drugiego rzędu. Bierze w tym udział PE [15-17] w tym PE pochodząca z dekarboksylacji PS bogatej w kwas arachidonowy i dokozaheksaenowy [18], ale przede wszystkim PC [19].

## II. Przemiany fosfatydyloseryny i produktu jej dekarboksylacji

### II-1. Synteza fosfatydyloseryny

PS powstaje na drodze syntezy *de novo* tylko u *Prokaryota* i niższych *Eukaryota*. Na rycinie 1 przedstawiono tę drogę a także jej powiązanie z innymi szlakami syntezy fosfolipidów. PS powstaje w wyniku przyłączenia seryny do cytydynodifosforanu diacylo-1,2-*sn*-glicerolu (CDP-DAG) [6]. Należy zwrócić uwagę, że CDP-DAG jest fosfolipidowym substratem zarówno dla syntazy PS jak i syntazy fosfatydyloglicerofosforanu (PGP) (Ryc. 1). Tu rozwidlają się drogi prowadzące *via* PS do syntezy PE oraz *via* PGP do fosfatydyloglicerolu (PG) i kardioliptyny (CL).

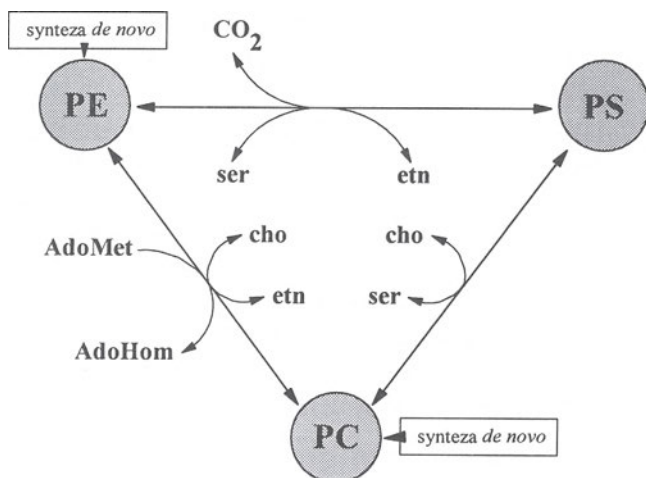
Wyróżniono dwie podklasy syntaz PS. Podklasa I to białka rozpuszczalne wiążące się z błonami, a więc prawdopodobnie peryferyjne białka błon. Druga to integralne białka błonowe. Pomiędzy syntazami podklasy I i II nie ma homologii. Do podklasy I należą takie enzymy jak syntaza PS z drożdży, bakteryjna syntaza kardioliptyny, nukleaza a także pochodząca z różnych źródeł fosfolipaza D [6] oraz syntaza PS u *E. coli*. Syntazę PS *E. coli* oczyszczono z frakcji rybosomalnej [6]. Białko ma dwie hydrofobowe sekwencje, a oba końce niosą ładunek dodatni. Grupa białek, do której należy, charakteryzuje się obecnością identycznej zduplikowanej sekwencji HKD, zawierające histydynę, lizynę i kwas asparaginowy, gdzie prawdopodobnie wiązany jest kowalencyjnie substrat zawierający resztę fosforanową. Ta hipoteza jest zgodna z tzw. mechanizmem ping-pong reakcji syntezy PS zaobserwowanym u *E. coli*, tzn. najpierw odłączany jest CMP od CDP-DAG a dopiero potem, do związanego z enzymem kwasu fosfatydowego, dołączana jest seryna i uwalniany produkt. Reakcja ta jest odwracalna,

a więc w obecności CMP zachodzi syntaza CDP-DAG [6]. Syntaza PS u *E. coli* może także przyłączać *sn*-glicero-3 fosforan a także glicerol, gdy występują one w wysokich stężeniach (odpowiednio 0.6 mM i 1 M). Dlatego mutanty, które nie posiadają genu kodującego syntazę PGP, zawsze zawierają pewną ilość PG i CL [6].

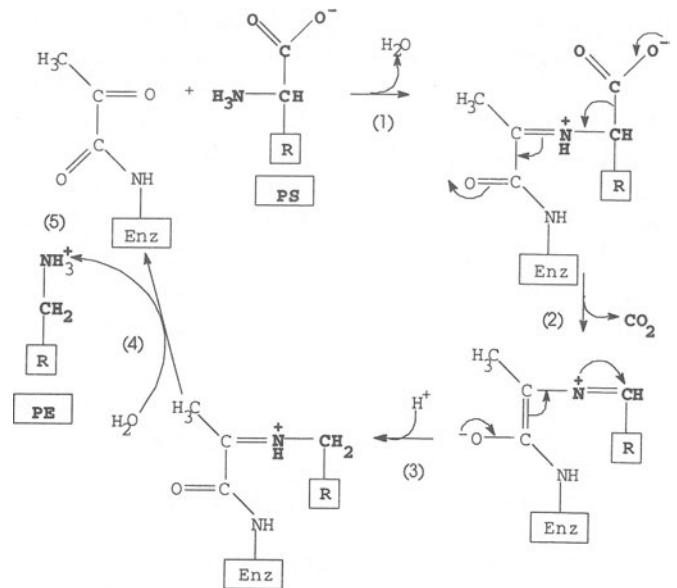
Do podklasy II syntaz należą syntazy PS z bakterii gram-dodatnich, *Archeobacteria* i niższych *Eukaryota*. Enzymy podklasy II takie jak wymienione wyżej syntazy PS, ale także syntazy PGP i PI, oraz transferazy diacylo-1,2-*sn*-glicerol: fosfocholina i fosfoetanolamina posiadają wspólną dla nich dużą konserwowaną sekwencję. Synteza PS katalizowana przez enzym podklasy II zachodzi według sekwencyjnego mechanizmu typu Bi-Bi, w którym wszystkie substraty biorące udział w reakcji muszą być związane z enzymem przed uwolnieniem pierwszego produktu. Z danych tych wynika, że ewolucyjne pochodzenie syntazy PS podklasy I i podklasy II jest zupełnie różne.

U wyższych *Eukaryota* np. w wątrobie szczura, PS syntetyzowana jest w wyniku wymiany zasady (etanolaminy i choliny) na serynę w już istniejących fosfolipidach, którymi są tylko PE i PC oraz w badaniach *in vitro* także PS (Ryc. 2). Reakcja wymaga obecności  $Ca^{2+}$  [1]. Nie ma jasności, ile jest enzymów wymieniających zasady u wyższych *Eukaryota* [20]. W mutantach PSA-3 fibroblastów z jajnika chomika chińskiego, auksotroficznym wobec PS, istnieją dwa enzymy wymieniające zasady [21]. PSS I wymienia zasadę na serynę w PC i prawdopodobnie także w PE, podczas gdy PSS II tylko w PE. Lipidowym substratem dla częściowo oczyszczonego z mikrosomów mózgu wołu enzymu jest także tylko PE [22]. Synteza PS jest hamowana przez nadmiar produktu reakcji [22].

Badano [23] syntezę różnych rodzajów molekularnych PS w hepatocytach oraz mikrosomach [24] z wątroby szczura. Stwierdzono, że nowo zsyntetyzo-



Ryc. 2. Synteza PS u wyższych *Eukaryota* zachodząca w wyniku przemian fosfolipidów PE — fosfatydyloetanolamina; PC — fosfatydylocholina; PS — fosfatydyloseryna; ser — seryna; etn — etanolamina; cho — cholina; AdoMet — adenylozylometionina; AdoHom — adenylozylhomocysteina.



Ryc. 3. Prawdopodobny schemat reakcji dekarboksylacji fosfatydyloseryny. Pierwszym etapem reakcji jest związanie PS do grupy karbonylowej znajdującej się w miejscu aktywnym enzymu z utworzeniem zasady Schiffa (1). Następujące po tym przegrupowanie elektronów faworyzuje dekarboksylację z jednoczesnym utworzeniem azometinowego pośrednika reakcji (2). Dołączenie protonu tworzy produkt (3), a dołączenie cząsteczki wody odtwarza grupę pirogronianową enzymu i uwalnia PE (5).

wana PS jest bogata w kwasy tłuszczowe — arachidonowy —  $C_{20:4}$  i dokozaheksaenowy —  $C_{22:6}$ , i że niewielka pula fosfolipidów bierze udział w syntezie tego lipidu, a droga deacylacji i reacylacji nie jest drogą tworzenia jej molekularnych rodzajów. Wydaje się więc, że reakcja syntezy PS jest specyficzna wobec lipidowych substratów zawierających kwasy tłuszczowe  $C_{18:0}/C_{20:4}$  i  $C_{22:6}$ , co więcej, następuje swoista selekcja rodzajów molekularnych PE i PC do syntezy PS zwłaszcza, że w mikrosomach wątroby szczura znajduje się ich niewiele.

## II-2. Dekarboksylacja fosfatydyloseryny

PS podlega reakcji dekarboksylacji katalizowanej przez dekarboksylazę PS. W wyniku reakcji powstaje PE. Oczyszczona z *E. coli* dekarboksylaza PS jest integralnym białkiem błonowym. Syntetyzowana jest jako proenzym, które podlega proteolizie do podjednostki  $\alpha$  zawierającej pirogronianową grupę prostetyczną i podjednostki  $\beta$ , która jest prawdopodobnie związana z błoną [10]. Takie aminokwasy jak: metionina, tyrozyna, tryptofan i arginina nie występują w podjednostce  $\alpha$  [10]. Dekarboksylacja PS u *E. coli* odbywa się przez utworzenie zasady Schiffa (Ryc. 3) pomiędzy aminową grupą substratu a resztą karbonylową grupą prostetycznej enzymu [10, 25].

Dekarboksylaza PS z *E. coli* nie wykazuje specyficzności wobec określonych rodzajów molekularnych substratu, chociaż np. lizofosfatydyloseryna nie jest dekarboksylowana [10]. Z drugiej strony ilość rodzajów molekularnych fosfolipidów u *E. coli* jest stosunkowo ograniczona, bowiem głównymi kwasami



tłuszczowymi są tu: kwas palmitynowy ( $C_{16:0}$ ), palmitoolejowy ( $C_{16:1}$ ,  $cis-\Delta^9$ ) i  $cis$ -wakceny ( $C_{18:1}$ ,  $cis-\Delta^{11}$ ).

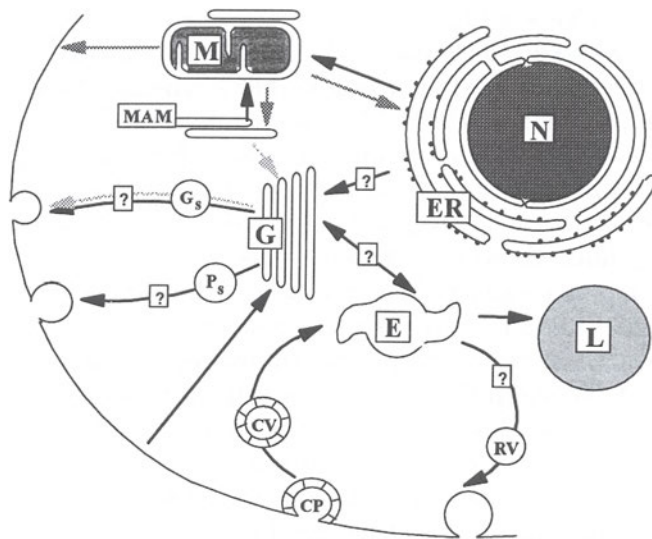
U *S. cerevisiae* znaleziono dwie dekarboksylazy PS: PSD1 i PSD2. Sklonowano i zsekwencjonowano drożdżowe i ssacze cDNA dla tego enzymu. Gen drożdżowy posiada 5' sekwencje podlegające regulacji ekspresji przez cholinę i inozytol. Zarówno drożdżowa PSD1 jak i ssacza PSD zawierają sekwencję aminokwasową LGST, która występuje także w proenzymie u *E. coli*, a która jest miejscem proteolizy i tworzenia reszty pirogronianowej u tej bakterii. Ponadto zarówno drożdżowa PSD1 jak i ssacza PSD, posiadają sekwencje kierujące i kotwiczące białko w wewnętrznej błonie mitochondrialnej. Podjednostka  $\alpha$  i  $\beta$  dekarboksylazy PS tworzone są dopiero po umieszczeniu tego białka w błonie. Reszta pirogronianowa leży we wszystkich trzech przypadkach w hydrofobowym rejonie podjednostki  $\alpha$  [10]. Gen *PSD2* koduje białko o ciężarze 130 kDa i stosunkowo niewielkim podobieństwie sekwencji aminokwasowej do produktu genu *PSD1* u drożdży [10].

Podobnie do enzymu z *E. coli*, dekarboksylaza PS w wątrobie szczura, nie wykazuje specyficzności substratowej [23]. Dekarboksyluje ona równie dobrze  $Pyr_xPS$  jak i NBD-PS [10]. Powstają więc takie same jak substrat rodzaje molekularne produktu [23]. Mogłoby to świadczyć o tym, że produkt reakcji dekarboksylacji nie powinien podlegać już dalszej deacylacji i reacylacji, chociaż nie można tego wykluczyć [26]. Podobnie jak u *E. coli* w mitochondriach mózgu wołu lizofosfatydyloseryna, *sn*-glicero-3-fosforan, fosfoseryna, czy seryna nie ulegają dekarboksylacji [27]. Należy też sądzić, że skoro reakcja dekarboksylacji PS jest reakcją tak powszechnie występującą w świecie żywym, to może one przebiegać według tego samego mechanizmu u *Eukaryota* jak u *Prokaryota* (Ryc. 3). Zdają się to potwierdzać analizy cDNA dla białka dekarboksylazy u drożdży i w fibroblastach z jajnika chomika chińskiego [10].

### II-3. Metylacja fosfatydyoetanoloaminy

*De novo* synteza PE i PC nie występuje u *Prokaryota* [28]. U drożdży główną drogą syntezy PC jest metylacja PE powstałej w wyniku dekarboksylacji PS [29]. Reakcja metylacji u drożdży prowadzona jest przez dwa enzymy używające adenozylometioniny jako donora reszt metylowych. Enzymy te kodowane są przez dwa oddzielne geny: *PEM1* koduje metylotransferazę przeprowadzającą dwie ostatnie reakcje metylacji a *PEM2* koduje enzym katalizujący pierwszą reakcję [29]. Geny te, podobnie jak gen kodujący syntazę PS są regulowane na poziomie transkrypcji przez inositol i cholinę a ich ekspresja zależy od fazy wzrostu komórki drożdży.

W wątrobie reakcję metylacji PE do PC przeprowadzają prawdopodobnie dwa enzymy *PEMT1*



Ryc. 4. Wewnątrzkomórkowy transport i lokalizacja enzymów metabolizmu fosfatydyloseryny i produktu jej dekarboksylacji w komórkach *Eukaryota*. M — mitochondrion, N — jądro komórkowe, L — lizosom, E — endosom wczesny, CV — pęcherzyk opłaszczony klatryną, CP — wgłębienie w błonie plazmatycznej opłaszczone klatryną, RV — pęcherzyki powracające, ER — endoplazmatyczne retikulum,  $P_s$  — pęcherzyk sekrecyjny,  $G_s$  — granulka sekrecyjna, G — aparat Golgiego, MAM — frakcja błon retikulum endoplazmatycznego związanych z mitochondriami. PS — strzałki czarne; PE pochodzące z dekarboksylacji PS — strzałki szare; PC pochodzące z metylacji zdekarboksylowanej PS — strzałki szare przerywane.

i *PEMT2*, z których jeden, *PEMT2*, został oczyszczony [12]. Wykazuje on 44% homologii do enzymu *PEM2* z drożdży. Metylotransferaza nie wykazuje specyficzności w stosunku do rodzajów molekularnych PE, jednak maksymalną aktywność ma w stosunku do rodzajów molekularnych zawierających dwu, lub więcej, nienasycone kwasy tłuszczowe [12]. Głównym produktem metylacji jest PC wzbogacona w  $C_{22:6}$  [12]. PE, która zawiera tylko nasycone kwasy tłuszczowe nie jest metylowana. Metylacja przeprowadzana jest według mechanizmu, gdzie pierwszym wiązającym substratem jest PE, a ostatnim odłączanym produktem — PC [12].

### III. Lokalizacja enzymów metabolizmu fosfatydyloseryny

Chociaż u *E. coli* syntazę PS oczyszczono z frakcji zawierającej rybosomy to reakcja syntezy produktu zachodzi w błonie cytoplazmatycznej, do której enzym przyłącza się wówczas, gdy zawiera ona CDP-DAG, czyli lipidowy substrat enzymu oraz inne kwaśne fosfolipidy. Skłania to do przypuszczenia, że syntaza PS może być enzymem regulowanym zmianami w składzie fosfolipidowym błon [6].

U drożdży synteza PS zachodzi w endoplazmatycznym retikulum oraz w zewnętrznej błonie mitochondrialnej [30]. Oba enzymy oczyszczono i stwierdzono, że oba kodowane są przez ten sam gen *PSS/CHO1* [30].

W komórkach wątroby szczura (Ryc. 4) synteza PS

zachodzi w endoplazmatycznym retikulum, głównie w szorstkim [31], oraz we frakcji MAM tj. endoplazmatycznym retikulum związanym z zewnętrzną błoną mitochondrialną [23]. Jak dotychczas nie ma zgodności co do faktu [32], po której stronie — luminalnej czy cytoplazmatycznej retikulum zachodzi ten proces [33]. Aktywność syntazy PSS I w komórkach fibroblastów z jajnika chińskiego chomika związana jest zarówno z mikrosomami jak i z frakcją MAM. Obie syntazy PSS I i PSS II mają sekwencję aminokwasową zakotwiczącą białko do endoplazmatycznego retikulum [30]. Wewnątrzkomórkowa lokalizacja enzymów biorących udział w syntezie poszczególnych fosfolipidów jest ciągle weryfikowana [6, 10, 20, 21].

Większość badaczy jest zgodna, że dekarboksylaza PS znajduje się w wewnętrznej błonie mitochondrialnej wątroby szczura [31, 34, 35], potwierdzono też wcześniejsze obserwacje [34], że enzym jest dostępny dla substratu od zewnętrznej strony tej błony [35, 36]. Aktywność dekarboksylazy PS znajdowano jednak także w zewnętrznej błonie mitochondriów wątroby myszy [37], w błonie plazmatycznej płytek krwi [38] czy sarkolemie serca [39]. Ostatnio odkryta dekarboksylaza PSD2 występuje we frakcji komórkowej zawierającej wakuole i pęcherzyki aparatu Golgiego [22]. Stwierdzono też, że miejsca kontaktu zewnętrznej i wewnętrznej błony mitochondrialnej u drożdży [40] i myszy [41] są wzbogacone w ten enzym.

Jak już wspomniano, produkt reakcji dekarboksylacji może być metylowany do PC. Enzymy, katalizujące te reakcje, zostały jak dotąd, znalezione u grzybów, a z tkanek ssaczych tylko w wątrobie, zarówno we frakcji mikrosomalnej, gdzie znajduje się PEMT1 jak i we frakcji MAM, gdzie znajduje się PEMT2 [12]. By zlokalizować ten enzym w komórce zastosowano przeciwciała przeciwko C-końcowemu fragmentowi PEMT2 oczyszczonej z mikrosomów, które jednak nie rozpoznają PEMT1 [12]. Metylacja PE katalizowana przez PEMT1 odbywa się po cytoplazmatycznej stronie endoplazmatycznego retikulum [12].

#### IV. Transport substratu i produktu dekarboksylazy fosfatydoseryny

PS u *Eukaryota* jest syntetyzowana wewnątrz komórki, ale może także pochodzić spoza niej. W obu przypadkach PS musi być przetransportowana do organelli, w których występuje, lub w których jest dalej metabolizowana. Badano następujące mechanizmy transportu nowosyntetyzowanych fosfolipidów: pączkowanie pęcherzyków i ich fuzja [41], transport monomerów na drodze spontanicznej [42] bądź stymulowanej białkiem [43] i wreszcie dyfuzję lateralną przez miejsca kontaktowe tworzone przez błony różnych organelli [44].

Endo- i egzocytoza powodują, że błony plazmatyczne muszą być ciągle odtwarzane bądź ulegać redukcji. Tworzące się z niej pęcherzyki wprowadzają do wnet-

rza komórki fosfolipidy wchodzące w skład ich błon (Ryc. 4). Z kolei pęcherzyki sekrecyjne tworzą się w aparacie Golgiego, w którym następuje też sortowanie fosfolipidów [45]. Stwierdzono, że błona plazmatyczna i aparat Golgiego są organellami zawierającymi w komórce największą ilość PS [46]. U drożdży np. obserwuje się w błonie plazmatycznej wzrost ilości PS w stosunku do pęcherzyków sekrecyjnych oraz w pęcherzykach sekrecyjnych w stosunku do retikulum endoplazmatycznego [47]. Wydaje się więc, że pęcherzykowy transport PS zsynchronizowanej w endoplazmatycznym retikulum powinien być skierowany głównie do błony plazmatycznej (Ryc. 4), gdzie po fuzji błon, fosfolipidy pęcherzyków wchodzą w skład tej ostatniej [48].

Badano także, czy transport fosfolipidów może zachodzić przy udziale białek. Stwierdzono, że PS może być przenoszona przez białko niespecyficzne transportujące lipidy [49]. Jakkolwiek *in vitro* białka te wykazują zdolność transportu fosfolipidów to okazało się, że *in vivo* pełnią one inne funkcje w komórce [43].

Natomiast coraz więcej jest danych świadczących, że transport PS z miejsca jej syntezy do organelli odbywa się poprzez kontakt z innymi organellami [40, 41, 50, 51]. Międzyorganellowy transport lipidów (Ryc. 4) może zachodzić dzięki istnieniu wyspecjalizowanych mikrodomen białkowo-lipidowych, które biorą udział w tworzeniu miejsc transportu zarówno w błonach retikulum endoplazmatycznego, jak i zewnętrznej błonie mitochondrialnej [50]. Zahamowanie aktywności dekarboksylazy PS powoduje np. gromadzenie się tego fosfolipidu we frakcji MAM [51]. Badano transport PS z retikulum endoplazmatycznego do mitochondriów w uprzepuszczalnych saponiną fibroblastach z jajnika chomika chińskiego [52] i stwierdzono, że zachodzi on na drodze kolizji błon. U drożdży translokacja PS do mitochondriów nie wymaga obecności ATP.

Wewnątrzmitochondrialny transport PS był w ostatnich latach bardzo intensywnie badany. Uważa się, że i on zachodzi poprzez miejsca kontaktowe [50], tworzone przez zewnętrzną i wewnętrzną błonę mitochondrialną [53] a transport odbywa się w miejscach kontaktowych na drodze dyfuzji lateralnej.

Wszyscy są zgodni [54], że PS jest nieomal symetrycznie rozmieszczona w błonach endoplazmatycznego retikulum w przeciwieństwie do błon plazmatycznych, gdzie aminofosfolipidy występują głównie po jej cytoplazmatycznej stronie [55]. Zarówno jednak asymetryczne jak i symetryczne rozlokowanie fosfolipidów w błonach biologicznych sprawia, że zarówno po ich syntezie, a większość fosfolipidów syntetyzowana jest po cytoplazmatycznej stronie endoplazmatycznego retikulum, jak i po ich przetransportowaniu do błon z innych miejsc, muszą one podlegać transbłonowemu przemieszczeniu. W erytrocytach asymetria PS i PE utrzymywana jest dzięki translokacji

aminofosfolipidowej zależnej od ATP i dzięki białkom cytoszkieletu itp. [55]. W błonie plazmatycznej fibroblastów transport PS z zewnętrznej do wewnętrznej warstwy błony zachodzi dzięki procesowi zależnemu od ATP i wrażliwemu na NEM [50]. Szybki transmembranowy ruch PS i innych fosfolipidów w endoplazmatycznym retikulum zachodzi za pośrednictwem białek selektywnych dla glicerofosfolipidów [54], lub jest stymulowany przez  $Ca^{2+}$  [55, 56].

PE pochodząca z dekarboksylacji PS pojawia się w zewnętrznej błonie mitochondrialnej [53, 57]. Stwierdzono, że PE pochodząca z dekarboksylacji PS jest także transportowana do endoplazmatycznego retikulum (Ryc. 4) w fibroblastach z nerki chińskiego chomika [57] i w *S. cerevisiae*, gdzie transport ten wymaga ATP [50]. W błonie plazmatycznej szybciej pojawia się PE pochodząca z dekarboksylacji PS niż z syntezy *de novo* [51]. Wiadomo tylko, że wewnątrzkomórkowy transport PE, pochodzący z syntezy *de novo* czy z dekarboksylacji PS, nie zachodzi poprzez aparat Golgiego [18]. Jaki mechanizm jest odpowiedzialny za transport PE -z mitochondriów do błony plazmatycznej — nie wiadomo. Sądzone, że transport ten odbywa się na drodze dyfuzji lateralnej przez miejsca kontaktu endoplazmatycznego retikulum z błoną plazmatyczną. Jednak w czasie mitozy transport PE w komórce nie ulega zakłóceniu, mimo że wszystkie organelła ulegają w tym czasie znacznej fragmentacji [58].

Fosfatydylocholina pochodząca z metylacji zdekarboksylowanej PS jest preferencyjnie włączana w sekcje lipoprotein z hepatocytów a więc może być transportowana na drodze egzocytarnej (Ryc. 4). Znajdowano ją bowiem zarówno w aparacie Golgiego jak i błonie plazmatycznej [59].

## V. Regulacja syntezy i dekarboksylacji fosfatydyloseryny

Geny syntezy PE w *E. coli* wydają się być genami konstytutywnymi. W mutantach charakteryzujących się nadprodukcją enzymów błonowych często nie obserwuje się ich zwiększonej aktywności. Istotnym elementem niezbędnym do uzyskania przez enzymy błonowe aktywności jest bowiem fakt ich wbudowania w błonę. Na przykład mutant *E. coli* charakteryzujący się zwiększoną syntezą dekarboksylazy PS produkuje jej 40 razy więcej niż szczep dziki [7], jednak tylko 50% enzymu włączane jest w błonę cytoplazmatyczną, reszta jest z nią tylko luźno związana [60]. Aktywność syntazy PS zależy od obecności jej substratu, CDP-DAG, jak i kwaśnych fosfolipidów w błonie. Tak więc w regulacji aktywności enzymów metabolizmu fosfolipidów u *E. coli* dużą rolę wydaje się pełnić odpowiedni skład lipidowy błony [6].

Pewną wskazówką dotyczącą regulacji syntezy PS może być fakt, że PE nie jest u *E. coli* fosfolipidem niezbędnym do życia, o czym wspomniano we wstępie. Tak więc to szlak prowadzący do syntezy kardiolipiny

a nie PE będzie ważny dla życia tej komórki. Wskazują na to także właściwości obu syntaz wykorzystujących ten sam lipidowy substrat (Ryc. 4). Reakcja katalizowana przez syntazę fosfatydyloglicerofosforanu zachodzi bowiem ze 100% wydajnością [6].

U *E. coli* to szybkość syntezy PS wpływa na szybkość jej dekarboksylacji. PS występuje tu w ilościach śladowych i dopiero mutanty, które pozbawione są genu kodującego dekarboksylazę, gromadzą ten fosfolipid [7]. Nagromadzenie PS następuje po znacznym opóźnieniu we wzroście mutantów, co oznacza, że potrzebny jest czas na syntezę białka enzymu, i że nie występuje ono w komórce w nadmiarze. Jest to więc enzym, którego synteza jest najprawdopodobniej indukowana w miarę potrzeb organizmu.

U ssaków reakcja syntezy PS drogą wymiany zasad zależy od stężenia  $Ca^{2+}$ , a więc zmiany stężenia tego kationu w endoplazmatycznym retikulum regulują aktywność enzymu. Z kolei zmiany poziomu wapnia w komórce mogą być wywoływane przez różnego rodzaju agonistów oddziałujących na receptory błon plazmatycznych [60]. Na syntezę PS mogą zatem wpływać różne substancje nie wnikaące do komórki, co obserwowano w komórkach Ehrlicha [61], gliomy C6 [62, 63] i w limfocytach Jurkata T [64]. Innymi czynnikami, które mogą regulować syntezę PS a tym samym jej transport i dekarboksylację są cholina i etanoloamina, które są rozpuszczalnymi substratami w reakcji wymiany zasad. Wpływają one bezpośrednio na włączanie seryny do fosfolipidów [23, 56] a więc na syntezę PS.

Dekarboksylacja PS w wątrobie szczura zależy natomiast nie tylko od szybkości syntezy PS, ale także od szybkości jej transportu do mitochondriów. Dekarboksylacja PS może być także regulowana przez stężenie L-seryny w środowisku [23]. W badaniach przeprowadzonych na świeżo wyizolowanych szczurzych hepatocytach, przy podwyższonej ilości seryny (2.5 mM) zsyntetyzowana z niej PS była 4-krotnie szybciej dekarboksylowana do PE niż w obecności 0.5 mM seryny.

Na syntezę i dekarboksylację PS i metylację powstałej PE w komórkach eukariotycznych wywiera także wpływ skład fosfolipidowy błon. Badania *in vitro* [65, 66] wykazały, że PS włączona do mikrosomów z wątroby szczura na drodze fuzji, przy niskich jej stężeniach hamowała wymianę seryny, a bardzo znacznie etanoloaminy [65]. Natomiast PS oraz PC włączone do zrekonstruowanych w obecności detergentu mikrosomów, hamowały znacznie wymianę seryny, natomiast PE ją stymulowała [66].

Trudno nie doceniać roli dekarboksylazy PS, bowiem to dzięki niej produkowana jest PE i dalej etanoloamina. Cała pula tego aminoalkoholu w świecie organizmów żywych pochodzi z dekarboksylacji PS.

Artykuł otrzymano 31 lipca 1997 r.  
Zaakceptowano do druku 1 lipca 1998 r.

1. Borkenhagen LF, Kennedy EP, Fielding L (1961) *J Biol Chem* **236**: PC28-PC30
2. Hübscher G, Dils RR, Pover WRF (1959) *Biochim Biophys Acta* **36**: 518-528
3. Nemer MJ, Elwyn DJ (1960) *J Biol Chem* **235**: 2070-2074
4. Wilson JD, Gibson KD, Udenfriend S (1960) *J Biol Chem* **235**: 3539-3543
5. Bremer J, Figard PH, Greenberg DM (1960) *Biochim Biophys Acta* **43**: 477-488
6. Matsumoto K (1997) *Biochim Biophys Acta* **1348**: 214-227
7. Hawrot E, Kennedy EP (1978) *J Biol Chem* **253**: 8213-8220
8. DeChavigny A, Heacock PN, Dowhan W (1991) *J Biol Chem* **266**: 5323-5332
9. Shi W, Bogdanow M, Dowhan W, Zusman DR (1993) *J Bacteriol* **175**: 7711-7714
10. Voelker DR (1997) *Biochim Biophys Acta* **1348**: 236-244
11. Arthur G, Lu X (1993) *Biochem J* **293**: 125-130
12. Vance DR, Walkey CJ, Cui Z (1997) *Biochim Biophys Acta* **1348**: 142-150
13. Burdge GC, Postle AD (1995) *Lipids* **30**: 719-724
14. Piomelli D (1993) *Curr Opin Cell Biol* **5**: 274-280
15. McNulty S, Lloyd GS, Rumsby RM, Sayner RM, Rumsby MG (1992) *Neuroscience Lett* **139**: 183-187
16. Kiss Z, Tomono M, Anderson WB (1994) *Biochem J* **302**: 649-654
17. Tomono M, Kiss Z (1994) *Arch Biochem Biophys* **314**: 217-223
18. Vance JE (1991) *J Biol Chem* **266**: 89-97
19. Exton JH (1994) *Biochim Biophys Acta* **1212**: 26-42
20. Jasińska R, Zborowski J (1989) *Post Biochem* **33**: 605-627
21. Kuge O (1997) *Biochim Biophys Acta* **1348**: 151-156
22. Kanfer JN (1992) *Methods in Enzymol* **209**: 341-348
23. Bjerve KS (1985) *Biochim Biophys Acta* **833**: 396-405
24. Ellingson JS, Seenayah B (1994) *Biochim Biophys Acta* **1213**: 113-117
25. Van Poelje PD, Snell EE (1990) *Annu Rev Biochem* **59**: 29-59
26. Samborski R W, Vance DE (1993) *Biochim Biophys Acta* **1167**: 15-21
27. Percy AK, Moore JF, Carson MA, Waechter CJ (1983) *Arch Biochem Biophys* **223**: 484-494
28. Kennedy EP, Weiss SB (1956) *J Biol Chem* **222**: 192-214
29. Kanipes MJ, Henry SA (1997) *Biochim Biophys Acta* **1348**: 134-141
30. Yamashita S, Nikawa J-J (1997) *Biochim Biophys Acta* **1348**: 228-235
31. Van Golde LMG, Raben J, Battenberg JJ, Fleischer B, Zambrano F, Fleischer S (1974) *Biochim Biophys Acta* **360**: 179-182
32. Bishop WR, Bell RM (1988) *Annu Rev Cell Biol* **4**: 579-610
33. Barańska J (1989) *FEBS Lett* **256**: 33-37
34. Zborowski J, Dygas A, Wojtczak L (1983) *FEBS Lett* **157**: 179-182
35. Voelker DR (1989) *J Biol Chem* **264**: 8019-8025
36. Simbeni R, Tangemann K, Schmidt M, Ceolotto C, Paltauf F, Daum G (1993) *Biochim Biophys Acta* **1145**: 1-7
37. Taki T, Matusumoto M (1973) *Japan J Exp Med* **43**: 219-224
38. Auchli L, Tsvetnitsky V, Yeboah FA, Gibbons WA (1993) *Biochem Soc Trans* **21**: 488S
39. Yakushev VS, Davydov VV (1985) *Tox Pharmacol* **3**: 45-46
40. Simbeni R, Pon L, Zinser E, Patauf F, Daum G (1991) *J Biol Chem* **266**: 10047-10049
41. Kobayashi T, Pagano RE (1989) *J Biol Chem* **264**: 5966-5973
42. Brown RE (1992) *Biochim Biophys Acta* **1113**: 375-389
43. Wirtz KWA (1997) *Biochem J* **324**: 353-360
44. Ardail D, Lermé F, Louisot P (1992) *Biochem Biophys Res Commun* **186**: 1384-1390
45. Van Meer G (1993) *Current Opinion in Cell Biol* **5**: 661-673
46. Daum G (1985) *Biochim Biophys Acta* **822**: 1-42
47. Zinser E, Sperka-Gottlieb CDM, Fasch E-V, Kohlwein SD, Paltauf F, Daum G (1991) *J Bacteriol* **173**: 2026-2034
48. Vance JE, Vance DE (1990) *Experientia* **46**: 560-569
49. Jasińska R, Zborowski J (1992) *Biochim Biophys Acta* **1105**: 207-212
50. Trotter PJ, Voelker DR (1994) *Biochim Biophys Acta* **1213**: 241-262
51. Vance JE, Shiao YJ (1996) *Anticancer Res* **16**: 1333-1339
52. Voelker DR (1993) *J Biol Chem* **268**: 7069-7074
53. Jasińska R, Zborowski J, Somerharju P (1993) *Biochim Biophys Acta* **1152**: 161-170
54. Buton X, Morrot G, Fellmann P, Seigneuret M (1996) *J Biol Chem* **271**: 6651-6657
55. Williamson P, Schlegel RA (1994) *Mol Membrane Biol* **11**: 199-216
56. Rakowska M, Jasińska R, Lenart J, Komańska I, Makowski P, Dygas A, Pikuła S (1997) *Mol Cell Biochem* **168**: 163-176
57. Voelker DR (1985) *J Biol Chem* **260**: 14671-14676
58. Warren G (1985) *Trends Biochem Sci* **10**: 439-443
59. Vance JE (1989) *Biochim Biophys Acta* **1006**: 59-69
60. Clapham DE (1995) *Cell* **80**: 259-268
61. Rakowska M, Wojtczak L (1995) *Biochim Biophys Res Commun* **207**: 300-305
62. Czarny M, Barańska J (1993) *Biochim Biophys Res Commun* **194**: 577-583
63. Czarny M, Sabała P, Ucieklak A, Kaczmarek L, Barańska J (1992) *Biochem Biophys Res Commun* **186**: 1582-1587
64. Pelassy C, Breittmayer JP, Aussel C (1992) *Biochem J* **288**: 785-789
65. Zborowski J, Corazzi L, Arienti G (1991) *Biosci Rep* **11**: 231-236
66. Rakowska M, Dygas A, Corazzi A, Arienti G, Zborowski J (1992) *Biochem Int* **27**: 37-44



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.

# Liposomowe nośniki materiału genetycznego

## Liposome gene delivery system

MAREK LANGNER\*

### Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Powstawanie kompleksu lipid-DNA
- III. Przechodzenie kompleksu lipid-DNA przez błonę cytoplazmatyczną
- IV. Rozpad kompleksu i ekspresja genu
- V. Perspektywy na przyszłość

**Wykaz stosowanych skrótów:** DC-CHOL —  $3\beta$ [N-(N,N-dimetyloaminoetano)carbamoilo] cholesterol (ang.  $3\beta$ [N-(N,N-dimethylaminoethane)carbamoil] cholesterol); DMR-IE — bromek N-(2-hydroksyetylo)-N,N-dimetylo-2,3-bis(tetradecyloxy)-1-propanoiminowy (ang. N-(2-hydroxyethyl)-N,N-dimethyl-2,3-bis(tetradecyloxy)-1-propanaminium bromide); DODAP — 1,2-dioleilo-3-(dimetyloamino)propan (ang. 1,2-dioleoyl-3-dimethylaminopropane); DOTAP — 1,2-bis(olejoksy)-3-(trimetyloamnio)propan (ang. 1,2-bis(oleoyloxy)-3-(trimethylammonio)propane); DOPE — dioleilo fosfatidylaoetanolamina (ang. dioleoyl phosphatidylethanolamine); DOSPA — sól 2-1,2-dioleijpropylo-dimetylo-bromamnio)-N-etylo-6-amidospermin kwasu tetra trifluoroocetowego (ang. 2-(1,2-dioleoyloxypropyldimethylammonium bromide)-N-ethyl-6-amidospermine tetra trifluoroacetic acid salt); DOTMA — chlorek N-[1-(2,3-diolejołoksy)propylo]-N,N,N-trimetyloamnioowy (ang. N-[1-(2,3-dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammonium chloride); GAP-DLPIE — bromek N(3-aminopropylo)-N,N-dimetylo-2,3-bis(dodecyloksy)-1-propaniminioowy (ang. N(3-aminopropyl)-N,N-dimethyl-2,3-bis(dodecyloxy)-1-propanaminium bromide).

### I. Wstęp

Transfekcja to kontrolowana modyfikacja genotypu komórki powstała w wyniku dostarczenia z zewnątrz i wbudowania do jądra komórkowego dodatkowej informacji genetycznej. Aby nastąpiła ekspresja przenoszonego genu cząsteczka DNA musi pokonać barierę błony cytoplazmatycznej, a po wnikięciu do wnętrza komórki, chroniona przed rozkładem, powinna wnikać do jądra komórkowego. Po znalezieniu się w jądrze komórkowym materiał genetyczny musi zostać zintegrowany z macierzystą pulą genów oraz odczytany przez komórkę. W końcu, wprowadzona informacja powinna podlegać zwykłym procesom kontroli fizjologicznej [1].

Wprowadzenie materiału genetycznego do komórek rozrodczych praktykuje się już od dawna. W tym przypadku powszechnie stosuje się metodę mechaniczną

### Contents:

- I. Introduction
- II. Fomation of the lipid-DNA complex
- III. Transfer of the lipid-DNA complex through the plasma membrane
- IV. Degredation of the complex and gene expression
- V. Future perspectives

nej mikromanipulacji, polegającej na wprowadzeniu materiału genetycznego do komórki przez nakłucie mikropipetą błony cytoplazmatycznej. Jednakże metody tej nie da się zastosować do licznej populacji komórek, nie ma także możliwości dostosowania jej do warunków panujących *in vivo*. Aby przeprowadzić transfekcję na licznej populacji komórek stosuje się niszczące błonę cytoplazmatyczną czynniki fizykochemiczne (wysokie stężenie soli, elektropulsacja itp.). Poważnym ograniczeniem tych zabiegów jest: wynosząca zaledwie kilka procent wydajność transfekcji, głównie w wyniku wysokiej śmiertelności modyfikowanych komórek. Również, podobnie jak mikromanipulacja, procedury te nie mogą być praktycznie stosowane *in vivo*.

Materiał genetyczny można także wprowadzić do komórki za pomocą wektora wirusowego (realne i potencjalne możliwości tej metody przedstawione są w artykule Sz a l i [2]). Technika ta polega na integracji przenoszonego fragmentu DNA z materiałem genetycznym wirusa. Następnie, w wyniku naturalnych procesów, materiał genetyczny wnika do jądra komórkowego gdzie ulega ekspresji. Metoda ta, choć obiecująca, wydaje się być sprawą dalszej przyszłości, szczególnie w zastosowaniach klinicznych. Podstawową trudnością, w tym przypadku, jest możliwość toksyczności składnika wirusowego oraz reakcja układu immunologicznego, który rozpoznaje i eliminuje wirusowy nośnik, a wraz z nim przenoszony materiał genetyczny.

Metodą najbardziej obiecującą, która nie posiada wyżej wymienionych mankamentów, wydaje się być technika wykorzystująca nośniki liposomowe (liposomy są to sferyczne agregaty lipidowe [3, 4]). Wydajność transfekcji uzyskiwana tą drogą jest wystarczająco wysoka, w niektórych przypadkach sięga nawet 10%-30% [5-7]. Dodatkowo, technika ta jest prosta, powtarzalna, nie toksyczna oraz obojętna immunologicznie, co czyni ją idealnym narzędziem

\* Dr, Katedra Fizyki i Biofizyki, Akademia Rolnicza, ul. Norwida 25, 50-375 Wrocław

w zastosowaniach klinicznych [8-13].

W prezentowanym opracowaniu pokazano aktualny stan wiedzy na temat transfekcji za pomocą nośników liposomowych. Opisano głównie metody formowania kompleksów lipid-DNA oraz ich oddziaływanie z błoną cytoplazmatyczną. Zachowanie się kompleksu lipid-DNA w cytoplazmie nie jest do końca zbadane, co znajduje swoje odbicie w pobieżnym potraktowaniu tego aspektu zagadnienia. W końcowej części tego opracowania będą przedstawione przykłady zastosowania tej techniki do terapii genowej.

## II. Powstawanie kompleksu lipid-DNA

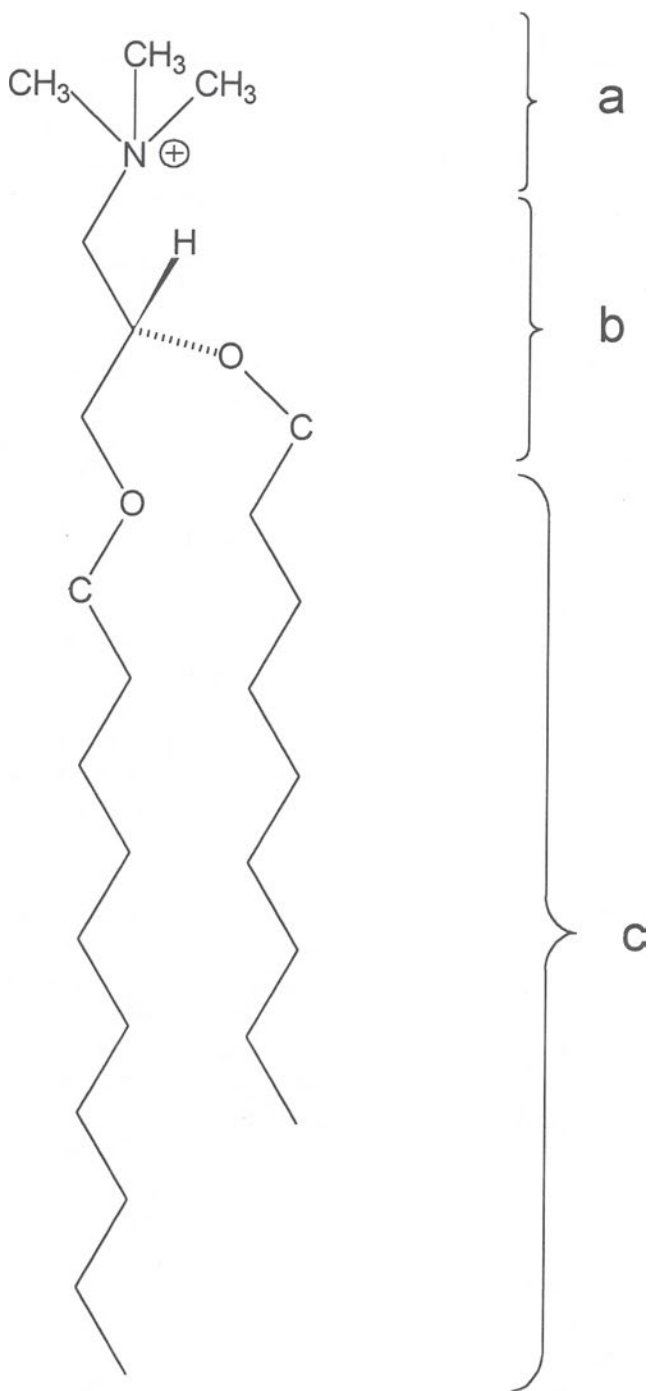
O skuteczności transportu materiału genetycznego do wnętrza komórki za pomocą liposomów kationowych decydują właściwości fizykochemiczne kompleksu lipid-DNA. Lipidy kationowe w fizjologicznym pH posiadają wypadkowy ładunek dodatni, co powoduje, że ujemnie naładowana cząsteczka DNA oddziałuje elektrostatycznie z obdarzoną ładunkiem powierzchnią liposomu [9, 14, 15]. Efektem tego oddziaływania są zmiany konformacyjne zachodzące zarówno w dwuwarstwie lipidowej, jak i w samej cząsteczce DNA. Charakter tych zmian zależy od składu liposomów, gęstości ładunku na ich powierzchni, warunków panujących w roztworze (siła jonowa, pH, obecność jonów dwuwartościowych [16]), a także od ilości naładowanego lipidu [9, 17]. W wyniku wzajemnych oddziaływań struktura liposomów podlega modyfikacji, co może doprowadzić do ich fuzji lub zmiany stanu konformacyjnego dwuwarstwy. Charakter tych zmian zależy w dużej mierze od wzajemnych proporcji obdarzonych ładunkiem lipidów i DNA [15, 18, 19]. Sama cząsteczka DNA także doznaje przemian konformacyjnych, w wyniku których drastycznie zmniejszają się jej efektywne rozmiary (tzw. „efekt kondensacji”). Podłożem tego zjawiska jest neutralizacja ujemnego ładunku, którym obdarzona jest helisa DNA [15, 20, 21].

Kompleks lipid-DNA powstaje w rezultacie zmian konformacyjnych zachodzących w helisie DNA i w oddziałujących z nią liposomach. W wyniku oddziaływań elektrostatycznych liposomy agregują z cząsteczką DNA tworząc struktury przypominające kiście winogron [21, 22]. Następnie ujemne ładunki związane z helisą DNA przyciągają lipidy kationowe, co powoduje, że na powierzchni liposomów tworzą się domeny [23]. Pojawienie się takich domen jest powodem destabilizacji dwuwarstwy lipidowej. Sądzi się także, że domeny te mogą również przeciwdziałać hydrolizie cząsteczki DNA przez enzymy nukleolityczne [15]. Odpowiednio dobrany stosunek ilościowy lipid-DNA sprawia, że cząsteczka DNA powoduje agregację liposomów. W tym czasie zachodzą równocześnie fuzja liposomów [21, 24] oraz zmiana konformacji przestrzennej cząsteczki DNA [10, 15, 25, 26]. W wyniku tych procesów powstaje kompleks, w którym cząsteczka DNA ma znacznie zredukowane rozmiary efektyw-

ne co sprawia, że łatwiej może ona wnikać do wnętrza komórki. Konformacja składowej lipidowej kompleksu nie jest do tej pory dobrze zbadana. Zależy ona od wielu czynników, w tym na przykład od składu lipidowego, czy warunków panujących w roztworze. Niektóre badania wskazują na to, że fuzja liposomów prowadzi do powstania ciągłej struktury lipidowej otaczającej cząsteczkę DNA [21], inne, że cząsteczka DNA nie powoduje zniszczenia struktury liposomu a raczej lokuje się na jego powierzchni [15], jeszcze inne sugerują, że w kompleksie lipidy nie tworzą dwuwarstwy a uformowana struktura nie jest topologicznie ciągła [20, 22].

Jak już wspomniano wcześniej, wydajność transfekcji zależy w dużej mierze od składu frakcji lipidowej kompleksu. Do tej pory nie znaleziono jednoznacznej korelacji pomiędzy topologią kompleksu, a wydajnością transfekcji. Liposomy wykorzystywane do tworzenia kompleksów lipid-DNA z reguły formowane są z kilku składników. Jednym z nich musi być lipid, lub inna cząsteczka amfifilowa, która posiada dodatni ładunek w swojej części hydrofilowej. Wielkość tego ładunku oraz budowa chemiczna, zarówno części hydrofobowej jak i hydrofilowej składnika kationowego ma wpływ na wydajność przeniesienia materiału genetycznego do wnętrza komórki. Nie jest jak dotąd do końca jasna zależność pomiędzy rodzajem zastosowanego lipidu kationowego, a wydajnością transfekcji [11, 27-31]. Pewne jest natomiast, że wydajność transfekcji zależy zarówno od rodzaju lipidów, wchodzących w skład kompleksu jak i od rodzaju komórek, będących objektem transfekcji. Złożona zależność pomiędzy strukturą kompleksu, rodzajem komórek, a wydajnością transfekcji stwarza poważne trudności w stosowaniu tej techniki, ale jednocześnie pozwala mieć nadzieję, że możliwe jest osiągnięcie wysokiej selektywności tkankowej tej metody.

Kationowe związki amfifilowe wykorzystywane do formowania kompleksów lipid-DNA posiadają różnorodną strukturę chemiczną. Do najczęściej stosowanych kationowych związków amfifilowych należą: DODAB (1,2-dioleilo-3-(dimetyloamino)propan) [23]; DOTAP (1,2-dioleilo-3-(dimetyloamino)propan) [22, 32, 33]; DC-CHOL (3β[N-(N,N-dimetyloamino)etano]carbamilol cholesterol) [25, 29, 30, 34]; DMRIE (bromek N-(2-hydroksyetylo)-N,N-dimetylo-2,3-bis(tetradecyloxy)-1-propanoiminiowy) [11, 15, 33, 34]; DOTMA (chlerek N-[1-(2,3-dioleiloksy)propylo]-N,N,N-trimetyloamoniowy) [21, 27] oraz DOSPA (sól 2-(1,2-dioleilpropylo)dimetylo-bromamonio)-N-etylo-6-amidospermin kwasu tetra trifluorooctowego) [15, 28, 33]. Ogólnie rzecz biorąc amfifilowa cząsteczka posiadająca ładunek dodatni składa się z trzech części. Części hydrofobowej, która zapewnia lokalizację cząsteczki w dwuwarstwie lipidowej, dodatnio naładowanej części polarnej, która oddziałuje z DNA oraz części łączącej (Ryc. 1). Grupa łącząca decyduje o chemicznej stabilności związku oraz o jego możliwościach biode-



Ryc. 1. Budowa lipidu kationowego (DOTMA; chlorek N-[1-(2,3-diolejlksy)propyl]-N,N,N-trimetyloamoniowy). a, b i c oznaczają odpowiednio kationową grupę hydrofilową grupę łączącą i część hydrofobową.

gradacyjnych. Na przykład: łańcuchy alkilowe DOTMA i DMRIE są połączone z częścią polarną stabilnym wiązaniem eterowym, nie poddającym się łatwo procesom hydrolizy. Natomiast DOTAP posiada niestabilne wiązanie estrowe. Fizykochemiczne właściwości kompleksów lipid-DNA są zdeterminowane przez wzajemne proporcje przedstawionych części oraz przez strukturę części polarnej. Pokazano, że amfifile kationowe posiadające wielowartościowe grupy polarne są z reguły bardziej aktywne niż te obdarzone jednowartościowymi grupami polarnymi [14].

Budowa chemiczna kationowego związku amfifilowego ma istotne znaczenie w formowaniu się komplek-

su lipid-DNA, decyduje o zachowaniu się kompleksu lipid-DNA w roztworze, oraz wpływa na jego losy w cytoplazmie. Jednakże warunkiem koniecznym, aby powstał kompleks lipid-DNA jest posiadanie przez związek amfifilowy wypadkowego ładunku dodatniego. Wydajność transfekcji zdeterminowana jest w znacznej mierze przez wzajemny stosunek lipidów kationowych do DNA oraz przez stosunek związku kationowego do lipidu dopełniającego (liposomy używane do formowania kompleksów tworzy się z lipidów kationowych zmieszanych z innym lipidem, który zwany jest dopełniającym) [14, 17, 22, 34].

Z danych literaturowych wynika, że na dobór ilości i rodzaju lipidu dopełniającego mają wpływ dwa czynniki. Stabilność uzyskanej struktury dwuwarstwy lipidowej oraz steryczne oddziaływanie DNA z powierzchnią liposomów. Powszechnie używaną mieszaniną lipidów, dostępną także komercyjnie (preparat zwany Lipofektin<sup>TM</sup>), jest kationowy DOTAP i neutralny DOPE (dioleilofosfatidylolietanolamina) zmieszane w proporcjach 1 : 1 [32, 35].

Stabilność frakcji lipidowej kompleksu lipid-DNA decyduje o jego właściwościach fizykochemicznych w roztworze. Jeżeli rodzaj lipidu kationowego jest ustalony, to cechy dwuwarstwy lipidowej mogą być modyfikowane przez dobór lipidu dopełniającego. Powszechnie stosowanym fosfolipidem dopełniającym jest DOPE (dioleofosfatidylolietanolamina), ponieważ jego część polarna jest neutralna, a nienasycone łańcuchy węglowodorowe powodują, że formowane z jego udziałem dwuwarstwy są bardzo niestabilne [36, 37]. Sądzi się więc, że lipid ten jest także odpowiedzialny za fuzję kompleksu z błoną cytoplazmatyczną [19, 38]. Skłonności DOPE do formowania agregatów różnych od liposomów powodują, że kompleksy, w skład których wchodzi ten lipid, nie są stabilne w roztworach fizjologicznych: agregują i wytrącają się [39]. Problem ten staje się szczególnie uciążliwy gdy zawiesina kompleksów znajduje się w surowicy. Agregaty kompleksów, ze względu na znaczne rozmiary (ich wielkość sięga tysięcy nm), nie są zdolne do wprowadzenia materiału genetycznego do wnętrza komórek. W płynach fizjologicznych dodatnio naładowane kompleksy wystawione są dodatkowo na działanie ujemnie naładowanych białek, lipoprotein czy heparyny. Przyspiesza to ich agregację oraz powoduje rozdział frakcji lipidowej kompleksu od DNA w przestrzeni międzykomórkowej co znacznie ogranicza wydajność transfekcji *in vivo* [22, 25, 29, 30]. Nadmiernej agregacji kompleksów można zapobiec zmieniając skład frakcji lipidowej kompleksu. Na przykład: użycie jako lipidu uzupełniającego fosfatidylcholino stabilizuje dwuwarstwą lipidową zapobiegając tym samym agregacji liposomów [22]. Natomiast zmiana sterycznych właściwości powierzchni dwuwarstwy lipidowej poprzez dodanie reszt hydrofilowych do części polarnej lipidów zapobiega wiązaniu się ujemnie naładowanych makrocząstek surowicy. Przykładem tego typu podejścia

jest zastosowanie surfaktantów (substancji aktywnych powierzchniowo) jako składnika dopełniającego w kompleksach. Dobierając surfaktant o odpowiednich właściwościach części polarnej można regulować zachowanie kompleksów w roztworze fizjologicznym oraz wpływać na sposób, w jaki oddziałują one z błoną cytoplazmatyczną [25, 29, 30].

### III. Przechodzenie kompleksu lipid-DNA przez błonę cytoplazmatyczną

Wypadkowy ładunek dodatni znajdujący się na powierzchni liposomów winien przewyższać sumaryczny ładunek ujemny, którym obdarzona jest helisa DNA. Ten nadmiarowy ładunek dodatni kompleksu powoduje, że oddziałuje on elektrostatycznie z ujemnie naładowaną powierzchnią błony cytoplazmatycznej [40]. W konsekwencji powierzchnia modyfikowanej komórki pokryta jest kompleksami lipid-DNA, co niewątpliwie leży u podstaw dużej wydajności procesu prowadzącego do wnikięcia materiału genetycznego do wnętrza komórki. Dodatkowym czynnikiem mającym wpływ na oddziaływanie kompleksu z powierzchnią błony cytoplazmatycznej jest amfifilowy charakter kompleksu. Oznacza to, że kompleks spontanicznie lokuje się na granicy faz (na powierzchni błony biologicznej) [7, 26].

W momencie gdy agregat znajdzie się już na powierzchni błony cytoplazmatycznej pojawiają się dwie możliwości wnikięcia materiału genetycznego do wnętrza komórki. Może się to odbywać na drodze endocytozy lub poprzez fuzję kompleksu z błoną cytoplazmatyczną. Z badań przedstawionych w literaturze wynika, że obydwie drogi są możliwe i że nie wykluczają się wzajemnie. Sądzi się, że o tym, w jaki sposób kompleks wnika do komórki decyduje przede wszystkim skład frakcji lipidowej kompleksu. Jak już wcześniej wspomniano, oprócz lipidu kationowego, w skład frakcji lipidowej używanej do formowania kompleksów stosuje się przynajmniej jeszcze jeden składnik amfifilowy. Dobór stopnia nasycenia oraz miejsca, gdzie znajdują się podwójne wiązania w łańcuchach węglowodorowych lipidu pozwala wpływać nie tylko na stabilność kompleksu ale także na zachowanie się kompleksu we wnętrzu komórki [34]. W sytuacji gdy kompleks znajduje się na powierzchni błony, materiał lipidowy wchodzący w jego skład może spowodować spontaniczną fuzję kompleksu z dwuwarstwą lipidową błony cytoplazmatycznej, w rezultacie czego materiał genetyczny wnika do cytoplazmy. Skutkiem ubocznym takiej fuzji jest zaburzenie asymetrii błony mogące prowadzić do obumierania komórek. Paradoksalnie łatwość, z jaką kompleks zawierający DOPE łączy się z błoną biologiczną jest przeszkodą w osiągnięciu selektywności transfekcji wtedy, gdy celem jej jest modyfikacja tylko wybranej populacji komórek.

Obecność w kompleksie lipidu, który samoistnie

tworzy stabilne dwuwarstwy (np. fosfatydylocholino) znacznie ogranicza fuzjogenność tego kompleksu, a tym samym pozwala na wprowadzenie modyfikacji, która może podnieść selektywność transfekcji, przy jednoczesnym ograniczeniu toksyczności preparatu [22, 41, 42]. Stabilne w czasie preparaty są także łatwiejsze w użyciu, oraz pozwalają na podniesienie dawki DNA. Pewnym ograniczeniem stosowania stabilnych kompleksów jest jednak to, że wnikają one do komórki głównie na drodze endocytozy, co ogranicza ich zastosowanie tylko do komórek, które posiadają aparat endocytotyczny [22, 25, 29, 30].

### IV. Rozpad kompleksu i ekspresja genu

Jak stwierdzono w poprzednim rozdziale, kompleksy lipid-DNA wnikają do komórki na drodze fuzji z jej błoną lub poprzez endocytozę. Efektywność ich wnikania zależy z jednej strony od rodzaju komórek, ich wieku oraz poziomu aktywności, z drugiej zaś strony od składu frakcji lipidowej kompleksu [22, 27, 40, 43-45]. Z przeprowadzonych do tej pory badań wynika, że wydajność przenikania kompleksu przez błonę cytoplazmatyczną nie jest w prosty sposób skorelowana z wydajnością transfekcji [46].

Po przekroczeniu bariery błony cytoplazmatycznej losy kompleksu są w niewielkim stopniu poznane. Wiadomo tylko, że we wnętrzu komórki następuje rozdział lipidu od DNA. Cząsteczka DNA może teraz wniknąć do jądra komórkowego lub pozostać w cytoplazmie w postaci agregatu. Lipid, pozostający po rozpadzie kompleksów, wbudowywany jest w struktury błonowe komórki [22]. Nie do końca są także zbadane procesy decydujące o separacji składników kompleksu w cytoplazmie oraz mechanizmy transportu DNA do jądra. To właśnie brak wiedzy na ten temat utrudnia dobranie składu kompleksu pod kątem zwiększenia wydajności procesów wiodących do zoptymalizowania ekspresji materiału genetycznego dostarczonego do cytoplazmy komórki.

Na podstawie skąpych danych doświadczalnych na temat losu kompleksu po przekroczeniu błony cytoplazmatycznej oraz w oparciu o badania modelowe Z e l p h a t i i S z o k a zaproponowali mechanizm przechodzenia DNA z endosomów do cytoplazmy [47, 48]. Model ten opiera się na obserwacji, że warunkiem koniecznym aby nastąpiła ekspresja DNA w komórce jest oddzielenie lipidu od DNA. Samo wstrzyknięcie kompleksów do cytoplazmy nie prowadziło do ekspresji genów reporterowych [49, 50]. W oparciu o badania na układach modelowych, Z e l p h a t i i S z o k a zaproponowali mechanizm, który, może prowadzić zarówno do rozdziału materiału kompleksu jak i przechodzenie DNA z endosomów do cytoplazmy. Autorzy postulują, że kationowe liposomy mogą indukować spontaniczne przechodzenie lipidów anionowych (na przykład fosfatydyloseryny) z zewnętrznej do wewnętrznej monowarstwy błony endosomalnej.



Kompleksowanie się obu naładowanych lipidów powoduje zanik wypadkowego ładunku dodatniego, a to umożliwia oddzielenie DNA od frakcji lipidowej. Proces ten zachodzi jednocześnie z destabilizacją błony endosomów. Pozbawione otoczki lipidowej DNA wędruje do cytoplazmy, skąd może już wnikać do jądra komórkowego. Błona jądra komórkowego jest już stosunkowo dobrze przepuszczalna dla makromolekuł [3, 51]. Zaproponowany mechanizm poparty został doświadczeniami modelowymi, w których składniki wchodzące w skład kompleksów ulegały rozdzieleniu w obecności liposomów zawierających ujemnie naładowane lipidy [38, 45].

Jakkolwiek przebiega proces wnikania cząsteczki DNA do cytoplazmy to nie wydaje się, że krok ten jest decydujący o wydajności transfekcji. W przypadku niektórych hodowli komórkowych wnikający materiał genetyczny odkłada się w cytoplazmie w postaci agregatów, a dostarczony materiał genetyczny nie ulega ekspresji [46]. Ponadto, wprowadzenie cząsteczek DNA do cytoplazmy, czy to w czystej formie czy to w kompleksach z lipidami, nie prowadzi automatycznie do ekspresji przenoszonej informacji. Przejście do cytoplazmy dostarczonego materiału genetycznego z błony cytoplazmatycznej (w przypadku fuzji) czy z wnętrza endosomów (po endocytozie) powiązane jest w jakiś sposób ze strukturami błonowymi komórki. Wiadomo tylko, że aby transfekcja doszła do skutku musi nastąpić, przynajmniej częściowy, rozdział składników kompleksu [18, 19, 47, 48]. Dodatkowo, jeżeli wziąć pod uwagę chronologię czasową omawianych procesów, to okazuje się, że proces wnikania kompleksu do komórki oraz separacja DNA i lipidowego nośnika zachodzi względnie szybko (w przeciągu minut). Natomiast sama ekspresja dostarczonego genu zachodzi nie wcześniej niż po kilku godzinach. Wydaje się więc, że krytyczny etap transfekcji związany jest z wniknięciem cząsteczki DNA do jądra komórkowego co powiązane jest w nieokreślony jeszcze sposób z naturalnymi procesami komórkowymi. Świadczy o tym także obserwacja, z której wynika, że wydajność transfekcji związana jest ściśle ze stanem komórki. Badania przeprowadzone na hodowanych hepatocytach ludzkich pokazały, że transfekcja jest najwydajniejsza gdy komórki znajdują się w fazie S (faza replikacji DNA, w której obserwuje się podniesioną aktywność metaboliczną). Wydajność transfekcji maleje także z wiekiem hodowli [52].

Z przedstawionych powyżej faktów wynika, że wydajność transfekcji zależy od rodzaju stosowanego lipidu obdarzonego ładunkiem dodatnim oraz od lipidu dopełniającego. Skład lipidowy kompleksu wydaje się wpływać, nie tylko na formowanie się kompleksu i sposób w jaki przechodzi on przez błonę cytoplazmatyczną, ale także na wydajność przeniesienia dostarczonego DNA do jądra komórkowego. Na przykład: zastosowanie GAP-DLRIE, zamiast DOTAP, spowodowało podniesienie wydajności trans-

fekcji genu reporterowego acetylotransferazy chloroamfenikolowej (CAT) wbudowanego do plazmidu VR1332, w sytuacji gdy preparat podawany był do płuc myszy [31]. GAP-DLRIE posiadając podwójny ładunek dodatni może wpływać zarówno na sposób oddziaływania lipidu z DNA, jak i kompleksu z błoną cytoplazmatyczną a także na zachowanie się kompleksu w cytoplazmie. Zastosowany rodzaj lipidu dopełniającego może natomiast wpływać nie tylko na właściwości fizykochemiczne kompleksu w roztworze, czy zdolność do fuzji z błonami biologicznymi, ale także może mieć wpływ na modyfikację wydajności przenoszenia DNA z endosomów do jądra komórkowego [34].

## V. Perspektywy na przyszłość

Na podstawie danych literaturowych można stwierdzić, że liposomy kationowe są wygodnym i wydajnym narzędziem w badaniach genetycznych na wszystkich poziomach od hodowli komórkowych do zastosowań *in vivo*. Metoda ta pozwala niespecyficznie dostarczać materiał genetyczny do wybranych populacji komórek [10, 12, 13, 33, 53, 54].

Jak wynika z wcześniejszego opisu wydajność dostarczania DNA do komórek za pomocą liposomów kationowych jest bardzo wysoka. Praktycznie każda komórka poddana transfekcji ma w swojej cytoplazmie dostarczony materiał genetyczny. Jednak ekspresja genów w jądrze nie jest już tak wydajna. Przyczyny tego mogą tkwić w braku integracji czy niewłaściwym miejscem integracji wprowadzonego genu z macierzystym materiałem genetycznym. Postuluje się także istnienie, nieokreślonej jeszcze, bariery jaką napotyka DNA na drodze pomiędzy błoną cytoplazmatyczną i jądrem. Pewien postęp w tej dziedzinie uzyskano poprzez połączenie techniki liposomowej z wektorem wirusowym. Na przykład, zastosowanie fragmentu wirusa Sendai jako dodatkowego składnika liposomu kationowego podniosło znacząco wydajność transfekcji [55].

Brak wiedzy na temat mechanizmów molekularnych związanych z transportem cząsteczek DNA w cytoplazmie powoduje, że zaprojektowanie optymalnego nośnika materiału genetycznego nie jest na razie możliwe. W konsekwencji, badania prowadzi się metodą prób i błędów. Rezultatem tej sytuacji jest projektowanie nowych preparatów, które pozwolą jedynie na dalsze podniesienie wydajności transfekcji poprzez zwiększenie ilości materiału genetycznego oraz podniesienie selektywności metody [50, 56]. Jedną z takich prób jest zastosowanie mikroemulsji. Mikroemulsją jest zawiesina drobin oleju otoczonych monowarstwą lipidów kationowych i odpowiednio dobranych surfaktantów [25, 29, 30]. Przy okazji opracowywania tej techniki odkryto, że zmiany w części hydrofobowej surfaktanta nie mają znaczącego wpływu na stopień agregacji i właściwości kompleksu w roztworze suro-

wicy. Modyfikację właściwości fizykochemicznych emulsji można uzyskać tylko na drodze modyfikacji ich części polarnych. Sugeruje się, że cząsteczka DNA wiąże się z powierzchnią mikrosfery w wyniku oddziaływań elektrostatycznych, a oddziaływania steryczne pozwalają na precyzyjną regulację stopnia wiązania się DNA z jej powierzchnią. Mikrosfery nie są wrażliwe, w przeciwieństwie do wielu preparatów liposomowych, na obecność surowicy, co powoduje, że kompleks taki doskonale nadaje się do zastosowań *in vivo*. Ponadto, preparat ten pozwala zastosować bardzo wysokie stężenia materiału genetycznego, co w nośnikach liposomowych nie zawsze jest możliwe [29, 30].

Liposomy kationowe stosowane są powszechnie jako nośniki plazmidów, oligonukleotydów antysensowych [57, 58]. RNA [54, 59, 60] oraz białek do komórek eukariotycznych [61]. Kompleksy lipid-DNA znajdują zastosowanie jako nośniki materiału genetycznego w terapiach, w których leczenie opiera się na modyfikacji genotypu zmutowanych komórek i tkanek [32, 52-68]. Metoda ta jest już zatwierdzona do badań klinicznych w leczeniu czerniaka (ang. *malignant melanoma*) [68, 69]. Przeprowadzane są także pierwsze próby wymiany genu kodującego białko CFTR którego defekt jest odpowiedzialny za mukowiscydozę (ang. *cystic fibrosis*) [70-72].

Wykonano już wiele doświadczeń *in vivo* mających na celu modyfikację genotypu komórek w płucach [70, 73, 74], wątrobie [25, 75], mięśniach [76], naczyniach krwionośnych [65-67, 77-79], oraz komórek rakowych [68, 69, 80, 81]. Wydajność transfekcji wybranych komórek w organizmie bardzo zależy od sposobu, w jaki podawane są kompleksy. Kompleksy mogą być podawane dożylnie [25, 64, 75], przez drogi oddechowe w aerozolu [70, 72, 73] oraz stosowane powierzchniowo w leczeniu schorzeń skóry [82, 83]. Najlepsze rezultaty uzyskano gdy kompleks podawany był w postaci aerozolu do płuc. Badania histologiczne pokazały, że gen reporterowy  $\beta$ -galaktozydazy ulegał ekspresji w kilku procentach komórek epitaksjalnych pęcherzyków płucnych [31].

Na wstępie wspomniano już, że transfekcja za pomocą liposomów kationowych ma poważną przewagę nad transfekcją za pomocą wektora wirusowego. Stosowanie wektora wirusowego aktywuje układ immunologiczny co uniemożliwia wielokrotne stosowanie preparatu, liposomy są natomiast immunologicznie obojętne. Trzeba jednak stwierdzić, że żadna z dotychczas stosowanych technik nie pozwoliła na trwałą modyfikację genotypu komórek *in vivo*. We wszystkich prezentowanych do tej pory badaniach *in vivo*, transfekcja jest tylko przejściowa, po początkowej ekspresji genu reporterowego komórki tracą nabyte właściwości. Zjawisko to wymaga dalszych badań, a jego rozwiązanie jest kluczem do efektywnego stosowania terapii genetycznej.

Dotychczasowe badania nad systemowymi zastoso-

waniami kompleksów lipid-DNA wskazują na znaczną selektywność transfekcji. Kiedy kompleksy DOT-MA/Tween 80/DNA podaje się dożylnie myszom, wówczas największy poziom transfekcji występuje w komórkach epitaksjalnych płuc [25]. Tkankową czy komórkową selektywność można, do pewnego stopnia, regulować poprzez dobór rozmiarów kompleksów, rodzaju lipidów, czy ilością ładunku elektrostatycznego. Podejście to ma jednak swoje oczywiste ograniczenia. Duże nadzieje wiąże się z możliwością zastosowania białek jako jednego ze składników kompleksu [16, 75] oraz technik znakowania immunologicznego [56, 68, 84-88]. Rozwój techniki w tym kierunku pozwoli zapewne na podniesienie komórkowej selektywności metody.

Badania zaprezentowane w tej pracy pokazują, że technika liposomowa może stać się jedną z podstawowych sposobów dystrybucji leków w organizmie, a w szczególności, w szybko rozwijającej się terapii genowej. W połączeniu z współczesnymi metodami detekcji nieinwazyjnej (NMR czy znakowanie izotopowe) będzie ona niewątpliwie potężnym narzędziem w rękach współczesnej farmakologii.

#### Podziękowania

Autor dziękuje Profesorowi Stanisławowi Przestalskiemu i Dr Janinie Gabrielskiej za cenne uwagi dotyczące niniejszej pracy.

Artykuł otrzymano 15 grudnia 1997 r.

Zaakceptowano do druku 1 października 1998 r.

#### Piśmiennictwo

1. Tomilson E, Rolland A (1996) *J Control Rel* **39**: 357-372
2. Szala S (1995) *Post Biochem* **41**: 318-321
3. Gennis RH (1989) "Biomembranes. Molecular structure and function." New York, Springer-Verlag
4. Lasic DD, Templeton NS (1996) *Adv Drug Del Rev* **20**: 221-266
5. Hug P, Sleight RG (1991) *Biochim Biophys Acta* **1097**: 1-17
6. Rose JK, Buonocore L, Whitt MA (1991) *Biotechniques* **10**: 520-525
7. Zhang G, Gurtu V, Smith TH, Nelson P, Kain SR (1997) *Biochem Biophys Res Comm* **236**: 126-129
8. Behr JP, Demeneix B, Loeffler JP, Perez-Mutul J (1989) *Proc Natl Acad Sci USA* **86**: 6982-6986
9. Felgner PL, Ringold GM (1989) *Nature (Lond)* **337**: 387-388
10. Nicolau C, Cudd A (1989) *Crit Rev Ther Drug Carr Syst* **6**: 239-271
11. Gao X, Huang L (1991) *Biochem Biophys Res Comm* **179**: 280-285
12. Miller DA (1992) *Nature (Lond)* **357**: 455-460
13. Gao X, Huang L (1996) *Gene Therapy* **2**: 710-722
14. Felgner JH, Kumar R, Sridhar CN, Wheeler CJ, Tsai UJ, Border R, Ramsey P, Martin M, Felgner PL (1994) *J Biol Chem* **269**: 2550-25613
15. Eastman SJ, Siegel C, Tousignant J, Smith AE, Cheng SH, Scheule RK (1997) *Biochim Biophys Acta* **1325**: 41-62
16. Legendre JY, Szoka Jr. FC (1992) *Pharm Res* **9**: 1235-1242
17. Farhood H, Serbina N, Huang L (1995) *Biochim Biophys Acta* **1235**: 289-295
18. Mahato RI, Takakura Y, Hashida M (1997) *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* **14**: 133-172

19. Mahato RI, Rolland A, Tomlinson E (1997) *Pharmaceutical Res* **14**: 853-859
20. Spector MS, Schnur JM (1997) *Science* **275**: 791-792
21. Gershon H, Ghirlando R, Guttman SB, Minsky A (1993) *Biochem* **32**: 7143-7151
22. Hui SW, Langner M, Zhao Y-L, Ross P, Hurley E, Chan K (1996) *Biophys J* **71**: 590-599
23. Mitrakos P, MacDonald PM (1996) *Biochem* **35**: 16714-16722
24. Akhtar S, Basu S, Wickstrom E, Juliano RL (1991) *Nucleic Acid Res* **19**: 5551-5559
25. Liu F, Qi H, Huang L, Liu D (1997) *Gene Therapy* **4**: 517-523
26. Zhang YP, Reimer DL, Zhang G, Lee PH, Bally MB (1997) *Pharmaceutical Res* **14**: 190-196
27. Duzgunes N, Goldstein A, Friend DS, Felgner PL (1989) *Biochem* **28**: 9179-9184
28. Leventis R, Silvius JR (1990) *Biochim Biophys Acta* **1023**: 124-132
29. Liu F, Yang J, Huang L, Liu D (1996) *Pharmaceutical Res* **13**: 1856-1860
30. Liu F, Yang J, Huang L, Liu D (1996) *Pharmaceutical Res* **13**: 1642-1646
31. Wheeler CJ, Felgner PL, Tsai YJ, Marshall J, Sukhu L, Doh SG, Hartikka J, Nietupski J, Mnathorpe M, Nichols M, Plewe M, Liang X, Norman J, Smith A, Cheng SH (1996) *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 11454-11459
32. Wilke M, Bijma A, Timmers-Reker AJT, Scholte BJ, Sinaasappel M (1997) *Gene Therapy* **4**: 1305-1312
33. Berok Z, Abai AM, Dong JY, King SA, Kirk KL, Berta G, Hughes BW, Kraft AS, Burgess SW, Shaw W, Felgner PL, Sorscher EJ (1996) *J Pharmacol Exper Therapeutics* **279**: 1462-1469
34. Fasbender A, Marshall J, Moninger TO, Grunst T, Cheng S, Welsh MJ (1997) *Gene Therapy* **4**: 716-725
35. Hawley NP, Ciccarone V, Gebeyehu G, Jessee J (1993) *Focus* **15**: 73-79
36. Allen TM, Hong K, Papahadjopoulos D (1990) *Biochem* **29**: 2976-2985
37. Wimley WC, Thompson TE (1991) *Biochem* **30**: 4200-4204
38. Friend DS, Papahadjopoulos D, Debs RJ (1996) *Biochim Biophys Acta* **1278**: 41-50
39. Ellens H, Bentz J, Szoka PC (1986) *Biochem* **25**: 285-294
40. Felgner PL, Gadek TR, Holm M, Roman R, Chan H W, Wenz M, Northrop JP, Ringold GM, Danielsen M (1987) *Proc Natl Acad Sci USA* **84**: 7413-7417
41. Zhou X, Huang L (1992) *Controlled Release* **19**: 269-274
42. Zhou X, Kibanov AL, Huang L (1992) *Liposome Res* **2**: 125-139
43. Zhou X, Huang L (1994) *Biochim Biophys Acta* **1189**: 195-203
44. Wrobel L, Collins D (1995) *Biochim Biophys Acta* **1235**: 296-304
45. Stamatatos L, Leventis R, Zuckermann MJ, Silvius JR (1988) *Biochem* **27**: 3917-3925
46. Stagmann T, Legendre JY (1997) *Biochim Biophys Acta* **125**: 71-79
47. Zelphati O, Szoka Jr FC (1996) *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 11493-11498
48. Xu Y, Szoka FC (1996) *Biochem* **35**: 5616-5623
49. Capecchi MR (1980) *Cell* **22**: 479-483
50. Zabner W, Kichler A, Schmidt W, Sinski A, Wagner E (1996) *Biotechniques* **20**: 905-913
51. Miller M, Park MK, Hanover JA (1991) *Physiol Rev* **71**: 909-949
52. Ourlin JC, Vilarem MJ, Daujat M, Harricane MC, Domergue J, Joyeux H, Baulieux J, Maurel P (1997) *Analytical Biochem* **247**: 34-44
53. Felgner PL, Tsai YJ, Sukhu L, Wheeler CJ, Manthorpe M (1995) *Ann NY Acad Sci* **772**: 126-139
54. Gao X, Huang L (1993) *Nucleic Acid Res* **21**: 2867-2872
55. Yonemitsu Y, Kaneda Y, Muraishi A, Yoshizumi T, Sugimachi K, Sueishi K (1997) *Gene Therapy* **4**: 631-638
56. Zabner J, Fasbender AJ, Monsinger T, Poellinger KA, Welsh MJ (1995) *J Biol Chem* **270**: 18997-19007
57. Thierry AR, Rahman A, Dritschilo A (1992) "Liposomal delivery as a new approach to transport antisense oligonucleotides." in *Gene Regulation* (Erickson R.P. i Izant G. Ed.) pp. 147-161, Raven Press, New York
58. Wagner R (1994) *Nature (Lond)* **372**: 333-335
59. Malone RW, Felgner PL, Verma IM (1989) *Proc Natl Acad Sci USA* **86**: 6077-6081
60. Dzau VJ, Pratt RE (1992) *J Vasc Surg* **15**: 934-935
61. Litzinger DC, Huang L (1992) *Biochim Biophys Acta* **1113**: 201-227
62. Fallaux FJ, Hoeben RC, Briet E (1995) *Thromb Haemostatis* **74**: 266-273
63. Philip R, Liggitt D, Phillip M, Dazin P, Debs R (1993) *J Biol Chem* **268**: 16087-16090
64. Zhu N, Liggitt D, Liu Y, Debs R (1993) *Science* **261**: 209-211
65. Nabel EG, Cfacc GP, Nabel GJ (1991) *J Am Coll. Cardiol.* **17**: 189B-194B
66. Nabel EG (1995) *Circulation* **91**: 541-558
67. Morishia R, Gibbons GH, Ellison KE, Lee W, Zhang L, Yu H, Kaneda Y, Ogihara T, Dzau V (1994) *J Clin Invest* **94**: 978-984
68. Park JW, Hong K, Kirpotin DB, Papahadjopoulos D, Benz CC (1997) *Adv Pharmacol* **40**: 399-431
69. Nabel GJ, Nabel EG, Yang ZY, Fox BA, Plautz GE, Gao Z, Huang L, Shu S, Gordon D, Chang AE (1993) *Proc Natl Acad Sci USA* **90**: 11307-11310
70. Brigham KL, Meyrick B, Chirstman B, Magnusson M, King G, Berry LC (1989) *Am J Med Sci* **298**: 278-281
71. Sorscher EJ, Logan J, Lyrene R, Frizzell R, Berok Z, Dong JY, DuVall MD, Felgner PL, Matalon S, Walker L (1994) *Human Gene Ther* **5**: 1259-1299
72. Caplen NJ, Alton EW, Middleton PG, Dorin JR, Stevenson BJ, Gao Z, Durham SR, Jeffery PK, Hodson ME, Coutelle C, Huang L, Porteous DJ, Williamson R, Geddes DM (1995) *Natur Med* **1**: 39-46
73. Bennett MJ, Nantz MH, Balasubramanian RP, Gruenert DC, Melone RW (1995) *Bioscience Reports* **15**: 47-53
74. Lee ER, Marshall J, Siegel CS, Jiang C, Yew NS, Nichols MR, Nietupski JB, Ziegler RJ, Lane MB, Wang KX, Wan NC, Scheule RK, Harris DJ, Smith AE, Cheng SH (1996) *Hum Gene Ther* **7**: 1701-1717
75. Kaneda Y, Iwai K, Uchida T (1989) *Science* **243**: 275-238
76. Wolff A, Malone RW, Williams P (1990) *Science* **247**: 1456-1468
77. Gibbons GH, Dzau VJ (1996) *Science* **272**: 689-693
78. Keogh MC, Chen D, Lupu F, Shaper N, Schmitt JF, Kakkar VV, Lemoine N R (1997) *Gener Therapy* **4**: 162-171
79. Plautz GE, Nabel GJ (1993) *J Liposome Res* **3**: 179-199
80. Labroille G, Bonnefille S, Belloc (1996) *Promega Notes* **56**: 8-13
81. Missol E, Sochanik A, Szala S (1995) *Cancer Lett* **97**: 189-193
82. Cevc G (1997) *Exp Opin Invest Drugs* **6**: 1887-1937
83. Cevc G (1996) *Critical Rev Therapeutics Drug Carrier Systems* **13**: 257-388
84. Cheng PW (1996) *Hum Gene Ther* **7**: 275-282
85. Plank C, Zatloukal K, Cotten M, Mechtker K, Wagner E (1992) *Bioconj Chem* **3**: 533-539
86. Wagner E, Cotten M, Mechtler K, Kirkappos H, Birnsteil ML (1991) *Bioconj Chem* **2**: 226-231
87. Wagner E, Zatloukal K, Cotten M, Kirlappos H, Mechtler K, Curierl D, Birnsteil ML (1992) *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 6099-6103
88. Ledley FD (1996) *Pharm Res* **13**: 1595-1614

# Oligonukleotydy o właściwościach aptamerycznych

## Oligonucleotides with aptameric properties

AGNIESZKA KRAKOWIAK<sup>1</sup>  
MARIA KOZIOŁKIEWICZ<sup>2</sup>

### Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Poszukiwanie aptamerów oligonukleotydowych
  - II-1. Kombinatoryczne biblioteki oligonukleotydów
  - II-2. Metody selekcji cząsteczek o specyficznym fenotypie
  - II-3. Powielanie wyselekcjonowanych cząsteczek
- III. Aptamery dla wybranych białek wirusowych
  - III-1. Aptamery dla odwrotnych transkryptaz
  - III-2. Aptamery dla innych białek
- IV. Aptamery dla wybranych białek krwi
- V. Aptamery zawierające modyfikacje chemiczne
- VI. Aptamery dla przeciwciał
- VII. Aptamery dla cząsteczek o niskim ciężarze cząsteczkowym
- VIII. Podsumowanie

**Wykaz stosowanych skrótów:** PCR — łańcuchowa reakcja polimeryzacji; SELEX — metoda selekcji aptamerów; NMR — magnetyczny rezonans jądrowy; cDNA — DNA stanowiący kopię mRNA; RNaza H — rybonukleaza H;  $K_d$  — stała dysocjacji; AMV RT — odwrotna transkryptaza wirusa ptasiej białaczki; MMLV RT — odwrotna transkryptaza wirusa białaczki Moloney'a; HIV RT — odwrotna transkryptaza wirusa HIV;  $K_i$  — stała inhibicji;  $IC_{50}$  — stężenie, przy którym następuje 50% inhibicja; IN — integraza retrowirusowa; FIV — koci wirus niedoboru odporności immunologicznej; SIV — małpi wirus niedoboru odporności immunologicznej; TAR — region RNA wirusa HIV, do którego przyłącza się białko Tat; RBE — minimalny fragment RNA, do którego wiąże się wirusowe białko Rev;  $t_{1/2}$  — czas, po którym następuje 50% degradacja oligonukleotydu; PEG — glikol polietylenowy; HNE — ludzka elastaza neutrofilowa; RNaza T1 — rybonukleaza T1; bFGF — zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów;  $T_m$  — temperatura mięknienia dwuniciowych fragmentów kwasów nukleinowych, stosuje się również określenie temperatura topnienia; CHO — komórki nabłonka jajnika chomika chińskiego; BAE — komórki śródbłonna aorty wołu; HUVEC — ludzkie komórki śródbłonna żyły pępowinowej; all- $R_p$  — tiofosforanowy analog oligonukleotydu, posiadający wiązania internukleotydowe o konfiguracji wyłącznie  $R_p$ ; all- $S_p$  — tiofosforanowy analog oligonukleotydu, posiadający wiązania internukleotydowe o konfiguracji wyłącznie  $S_p$ ; snRNA U1 — cząsteczka jądrowego RNA zawierająca sekwencję komplementarną do miejsca splicingowego 5'; HeLa — komórki nabłonkowe wyprowadzone z raka szyjki macicy; SLE — układowy toczeń trumieniowaty.

### Contents:

- I. Introduction
- II. Search of oligonucleotide aptamers
  - II-1. Combinatorial oligonucleotide libraries
  - II-2. Selection of molecules with specific phenotypes
  - II-3. Amplification of selected molecules
- III. Some viral protein aptamers
  - III-1. Aptamers that bind to reverse transcriptases
  - III-2. Aptamers that bind to other proteins
- IV. Some blood protein aptamers
- V. Aptamers containing chemical modification
- VI. Aptamers that bind to antibodies
- VII. Aptamers that bind to small molecules
- VIII. Conclusions

### I. Wstęp

Rozwój technik biochemicznych i genetycznych, który nastąpił w ostatnich dwudziestu latach, spowodował znaczny postęp w poznawaniu molekularnych podstaw wielu chorób cywilizacyjnych takich jak np. choroby wirusowe, nowotworowe czy schorzenia układu krążenia. Wiedza o przyczynach tych chorób ułatwia poszukiwanie skutecznych metod ich leczenia.

Jako potencjalne terapeutyki rozważane są m.in. oligonukleotydy, czyli krótkie fragmenty DNA lub RNA, które można stosować w celu zahamowania syntezy niepożądanych białek bądź zmiany ich działania. Do oligonukleotydów, które mogą hamować syntezę białek, należą: oligonukleotydy antysensowne, które wiążą się z komplementarnymi fragmentami mRNA kodującego sekwencję aminokwasową tych białek; oligonukleotydy antygenowe, które wiążą się z komplementarnymi fragmentami DNA i tworzą struktury trójniciowe; oligonukleotydy o właściwościach katalitycznych (rybozymy), posiadające właściwość katalizowania degradacji komplementarnej nici mRNA. Podstawą działania tych trzech klas oligonukleotydów jest zdolność do asocjacji z komplementarnymi fragmentami DNA lub RNA. Oprócz nich znane są oligonukleotydy o właściwościach **aptamerów**, które wiążąc się bezpośrednio z określonymi białkami hamują ich działanie. Niniejszy artykuł zawiera przegląd literatury prezentującej sposoby poszukiwania oligonukleotydowych aptamerów oraz badania nad ich strukturą i efektami działania.

<sup>1</sup>Mgr, <sup>2</sup>dr, Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych, Zakład Chemii Bioorganicznej, PAN, 90-363 Łódź, ul. Sienkiewicza 112

Aptamerami nazwano cząsteczki kwasów nukleinowych, peptydów oraz peptoidów, wykazujące wysokie powinowactwo i specyficzność wiązania ze ściśle określonymi biomolekułami, np. białkami. Słowo *aptamer* pochodzi od łacińskiego słowa „*aptus*”, co oznacza *pasować*. Podkreśla ono fakt, że aptamer może wiązać się z docelową cząsteczką, ponieważ jego struktura przestrzenna „pasuje” do kształtu tej cząsteczki. Oddziaływania aptameru z cząsteczką docelową są realizowane przez wiązania niekowalencyjne (m.in. wiązania wodorowe, siły van der Waalsa oraz oddziaływania elektrostatyczne i hydrofobowe). Wśród opisanych dotychczas oligonukleotydowych aptamerów są takie, które wiążą się z białkami zaangażowanymi w metabolizm kwasów nukleinowych (takimi jak np. czynniki transkrypcyjne, polimerazy, integraza wirusa HIV i inne), jak również takie, które mają duże powinowactwo do białek nie wiążących się w warunkach *in vivo* z kwasami nukleinowymi (np. do trombiny i selektyn).

## II. Poszukiwanie aptamerów oligonukleotydowych

Pierwsze próby selekcji kwasów nukleinowych w warunkach *in vitro* przeprowadzono w laboratorium Spiegelmana, który w latach sześćdziesiątych usiłował generować nowe, efektywnie replikujące formy RNA kolifaga Q $\beta$  [1]. Jednakże dopiero w końcu lat osiemdziesiątych i na początku lat dziewięćdziesiątych nowoczesne techniki chemicznej syntezy oligonukleotydów, umiejętność otrzymywania fragmentów RNA na drodze transkrypcji *in vitro*, oraz powielania DNA metodą PCR, pozwoliły na opracowanie efektywnych metod identyfikacji cząsteczek o aktywności aptamerów i zastosowanie ich do analizy oddziaływań typu kwas nukleinowy-białko [2-10]. Metody te określane są jako **selekcja ligandów** (SELEX — *Systematic Evolution of Ligands by EXponential Enrichment*), **ukierunkowana ewolucja *in vitro*** lub **selekcja kombinatoryczna**. Z olbrzymiej i bardzo różnorodnej populacji oligonukleotydów nazywanych ligandami [11] dokonuje się wyboru tych cząsteczek, których struktura przestrzenna warunkuje silne wiązanie się z docelowymi biomolekułami. Z tej samej, odpowiednio dużej, populacji można uzyskać różne aptamery dla różnych cząsteczek docelowych. Pożądane jest, aby każdy z nich, wykazując wysokie powinowactwo do określonej cząsteczki docelowej (np. enzymu), nie oddziaływał z innymi rodzajami biomolekuł.

Poszukiwania oligonukleotydowych aptamerów stanowią element szybko rozwijających się obecnie badań określanych jako chemia kombinatoryczna. Badania te obejmują syntezę populacji cząsteczek określonej klasy związków chemicznych oraz selekcję tych cząsteczek, które wykazują pożądaną aktywność biologiczną. Dla podkreślenia molekularnej różnorodności owych populacji określa się je mianem *bibliotek kombinatorycznych*. W literaturze światowej można

również spotkać określenie „*biblioteki kształtów*” (ang. *shape library*). Ponieważ jest to jednak dość uproszczone określenie, w niniejszym opracowaniu w sposób zamierzony zrezygnowano z bezpośredniego tłumaczenia tego zwrotu i zastosowano termin *biblioteka kombinatoryczna*, już wcześniej zresztą użyty w polskim piśmiennictwie [12].

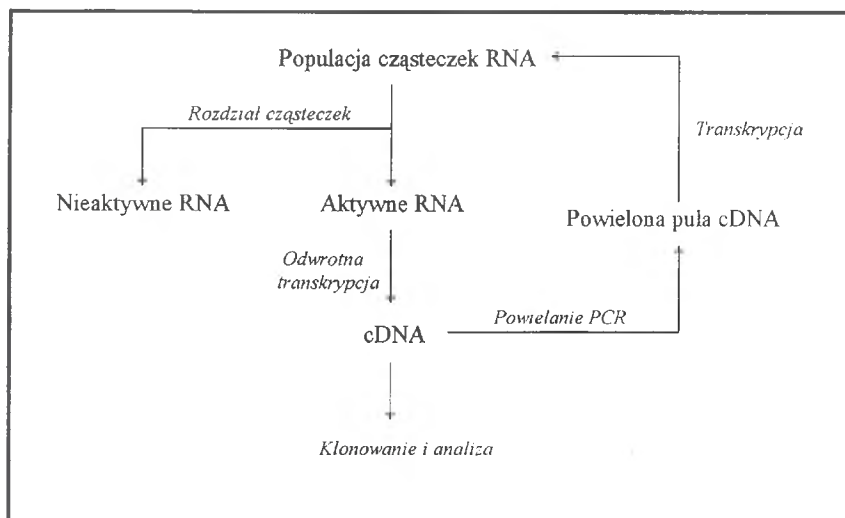
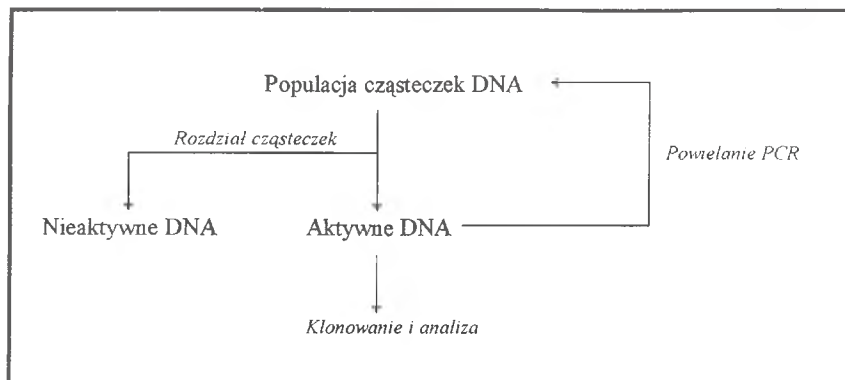
Kombinatoryczne biblioteki zawierające fragmenty DNA lub RNA umożliwiają poszukiwania nie tylko aptamerów oligonukleotydowych, ale także aptamerów o strukturze białkowej. Należy w tym celu wprowadzić syntetyczne fragmenty DNA do odpowiedniego systemu ekspresyjnego, gdzie w wyniku translacji utworzone zostaną odpowiednie białka fuzyjne o sekwencji aminokwasowej kodowanej przez te fragmenty. Głównym elementem obecnie znanych systemów ekspresyjnych stosowanych do otrzymywania owych białek są fagi, polisomy lub rybosomy, stąd odpowiednie techniki są określane jako, odpowiednio, *phage display*, *polysome display* oraz *ribosome display* [13-16]. Jednakże możliwości, jakie stwarzają te techniki, zostały zademonstrowane w pojedynczych zaledwie eksperymentach. Znacznie częściej stosowana jest wspomniana już technika *SELEX* umożliwiająca poszukiwanie aptamerów o strukturze DNA lub RNA.

Metodę selekcji ligandów można wykorzystać do poszukiwań aptameru, który wiązałby się z docelową biomolekułą znacznie silniej niż ligand występujący w naturze [17], a także do poszukiwań aptameru dla cząsteczki, która w warunkach *in vivo* nie oddziaływała z kwasami nukleinowymi. Teoretycznie istnieje możliwość wyselekcjonowania oligonukleotydowego aptameru dla każdej docelowej biomolekuły [11].

Kombinatoryczna selekcja *in vitro* obejmuje trzy kluczowe etapy: (1) utworzenie biblioteki oligonukleotydów, (2) selekcję oligonukleotydów wykazujących powinowactwo do docelowej cząsteczki, (3) powielanie wybranych ligandów. Etapy te są cyklicznie powtarzane i w każdym cyklu następuje stopniowe wzbogacanie puli cząsteczek w ligandy o pożądanym właściwościach (Ryc. 1).

### II-1. Kombinatoryczne biblioteki oligonukleotydów

Proces selekcji rozpoczyna się od utworzenia populacji różnych syntetycznych fragmentów DNA lub RNA zawierającej zazwyczaj pojedyncze cząsteczki o wysokim powinowactwie wobec cząsteczek docelowych. Początkowa molekularna różnorodność tej populacji wynika z użycia do jej syntezy mieszaniny monomerów [12]. Daje to w efekcie oligonukleotydy o tzw. zdegenerowanych sekwencjach (ang. *randomized synthesis*). Taką pulę oligomerów otrzymuje się stosując w każdym kolejnym cyklu chemicznej syntezy równomolową mieszaninę wszystkich monomerów. Inną możliwością stanowi tzw. limitowana wariacja sekwencyjna, czyli użycie różnych ilości każdego z mo-



Ryc. 1. A — Cykl selekcji DNA,  
B — Cykl selekcji RNA.

nomerów. Wybór metody zależy od intencji eksperymentatora. Ilość cząsteczek tworzących bibliotekę jest określona przez długość oligonukleotydu o zdegenerowanej sekwencji (im jest dłuższy — tym większa liczba cząsteczek) oraz przez ilość różnych monomerów, które mogą pojawić się w dowolnej pozycji łańcucha. Dla naturalnego DNA są to 4 monomery: dA, dG, dC i dT, co w przypadku oligomeru zawierającego  $n$  nukleotydów daje w efekcie przynajmniej  $4^n$  możliwych sekwencji. Możliwe jest również stosowanie w syntezie dodatkowych, zmodyfikowanych monomerów, co zdecydowanie zwiększa różnorodność sekwencyjną powstających fragmentów DNA i wzbogaca bibliotekę kombinatoryczną. Każda cząsteczka w bibliotece może mieć inną strukturę przestrzenną, co w sposób decydujący wpływa na jej powinowactwo do docelowych biomolekuł.

Zazwyczaj selekcję ligandów rozpoczyna się od chemicznej syntezy populacji cząsteczek DNA, gdyż jest ona bardziej efektywna i tańsza niż synteza RNA. Syntetyczne fragmenty DNA zawierają przypadkowe sekwencje nukleotydów tylko w środkowej części łańcucha oligonukleotydowego, natomiast 3'- i 5'-końcowe fragmenty muszą mieć zdefiniowaną sek-

wencję, ponieważ są to miejsca zaplanowane dla wiązania się starterów niezbędnych w reakcji powielania DNA metodą PCR lub inną metodą amplifikacji. Jeśli przedmiotem zainteresowania jest aptamer oligoribonukleotydowy, to dodatkowo na 5'-końcu planowanej sekwencji musi się znaleźć sekwencja promotora polimerazy RNA. Wprowadzenie do syntetyzowanych fragmentów DNA sekwencji promotorowej rozpoznawanej przez polimerazę RNA T7, SP6 lub T3 umożliwia przeprowadzenie w odpowiednim momencie transkrypcji *in vitro* i otrzymanie odpowiednich fragmentów RNA.

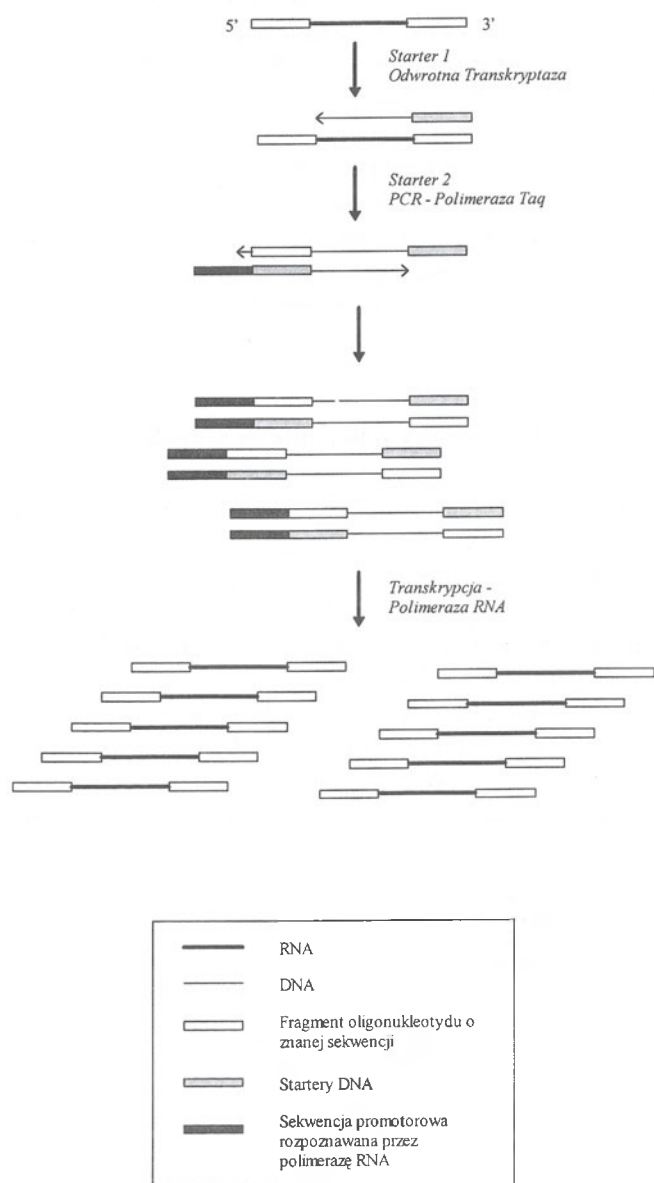
## II-2. Metody selekcji cząsteczek o specyficznym fenotypie (właściwościach fizycznych)

Kluczowym etapem w trakcie selekcji ligandów jest efektywne rozdzielenie cząsteczek aktywnych i nieaktywnych, a następnie powielenie cząsteczek aktywnych. Rozdział odbywa się na podstawie zdolności ligandu do wiązania się z docelowymi cząsteczkami. Jedną ze stosowanych metod jest procedura podobna do chromatografii powinowactwa. W przypadku aptameru trombiny cząsteczki aktywne i nieaktywne

rozdzielono na złożu zawierającym  $\alpha$ -trombinę immobilizowaną za pomocą konkanawaliny A (con A) na zmodyfikowanej agarozie [18]. W tym przypadku konieczne było wcześniejsze przeprowadzenie chromatografii na kolumnie wypełnionej agarozą związaną z konkanawaliną A w celu usunięcia z biblioteki kombinatorycznej ligandów wykazujących zwiększone powinowactwo do samej konkanawaliny. Inną metodą izolowania potencjalnych aptamerów jest filtracja na filtrach nitrocelulozowych. Filtrację stosowano m.in. dla otrzymania ligandów o wysokim powinowactwie do odwrotnej transkryptazy [19, 20]. Selekcję można także przeprowadzić za pomocą immunoprecypitacji, gdzie mieszaninę oligomerów inkubuje się z docelowym białkiem połączonym z przeciwciałem, którego obecność ułatwia izolowanie cząsteczek ligandów wykazujących powinowactwo do białka [21].

### II-3. Powielanie wyselekcjonowanych cząsteczek

Warunkiem przeprowadzenia procesu powielania



Ryc. 2. Powielanie metodą PCR.

jest obecność na 5'- i 3'-końcach oligonukleotydu sekwencji, które umożliwiają wiązanie się starterów dla Taq polimerazy DNA (reakcja PCR) oraz dla odwrotnej transkryptazy. Do powielania wyselekcjonowanych cząsteczek można zastosować jedną z dwóch opisanych niżej metod.

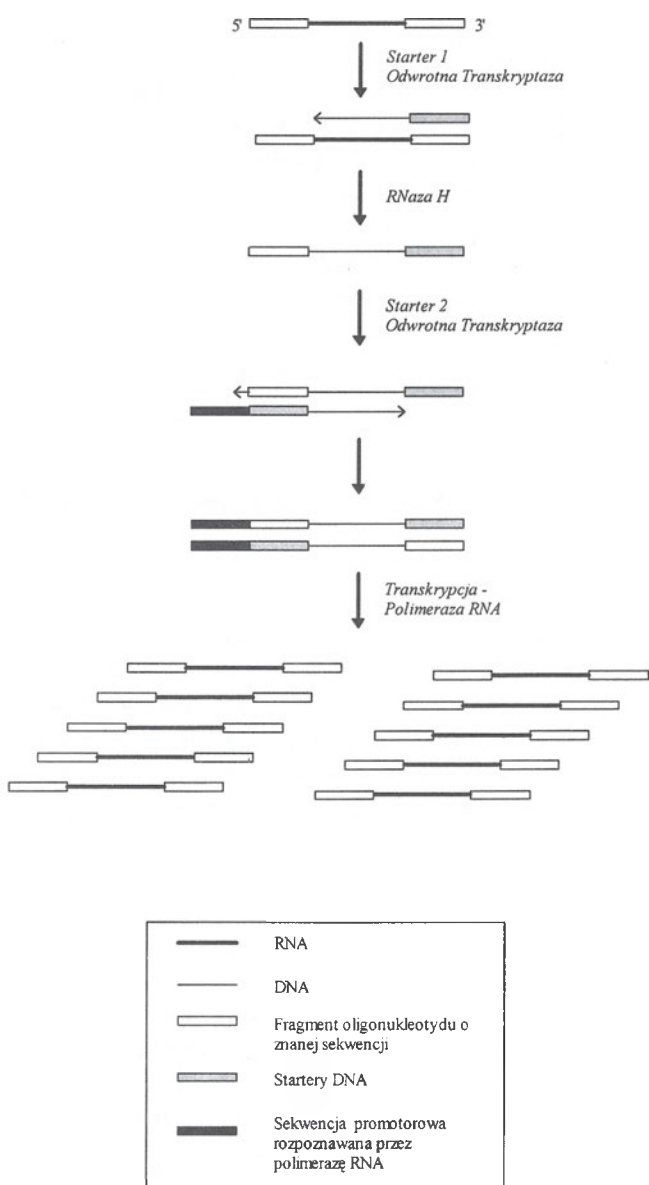
W pierwszej metodzie (Ryc. 2) podstawą jest reakcja PCR [22] przeprowadzana w sposób następujący: starter 1 poprzez hybryzację z komplementarnym miejscem znajdującym się na 3'-końcu powielanej sekwencji RNA umożliwia rozpoczęcie syntezy pojedynczej nici DNA katalizowanej przez odwrotną transkryptazę. Jest to etap występujący tylko w przypadku powielania RNA. Dodanie do mieszaniny reakcyjnej startera 2, komplementarnego do 5'-końca tej samej sekwencji umożliwia rozpoczęcie reakcji PCR katalizowanej przez Taq polimerazę DNA. Jeśli przedmiotem poszukiwań jest aptamer RNA, to otrzymany w wyniku reakcji PCR dwuniciowy DNA należy poddać reakcji transkrypcji *in vitro*, co jest możliwe pod warunkiem, że 5'-koniec startera 2 zawiera sekwencję promotorową rozpoznawaną przez polimerazę RNA. Powielenie cząsteczek następuje zarówno w trakcie reakcji PCR (przyrost  $10^6$ -krotny), jak i w trakcie transkrypcji (przyrost  $10^2$ -  $10^3$ -krotny). Dzięki temu liczba cząsteczek pożądanego ligandu zwiększa się około  $10^8$ -krotnie. W ten sposób, rozpoczynając od nanogramowej czy femtogramowej ilości wyjściowego materiału, można otrzymać tą metodą dziesiątki mikrogramów RNA lub DNA. Rzeczywisty poziom amplifikacji zależy od struktury II-rzędowej powielanych sekwencji, dobrania odpowiednich warunków reakcji i początkowego stężenia namnażanych cząsteczek.

Druga metoda (Ryc. 3) jest tzw. izotermiczną metodą amplifikacji (ang. *isothermal in vitro amplification* lub *transcription-based amplification system*) [23], która nadaje się do powielania cząsteczek RNA. Zasadniczą cechą tej metody, odróżniającą ją do innych metod amplifikacji jest fakt, że reakcje katalizowane przez trzy enzymy (odwrotna transkryptaza, RNaza H i polimeraza RNA) są prowadzone w temp.  $37^\circ\text{C}$ , w tej samej probówce. Tak jak w metodzie PCR (dla cząsteczek RNA), wymagana jest matryca RNA zawierająca miejsca wiązania starterów. Reakcja rozpoczyna się od hybryzacji startera z matrycą i syntezy nici DNA katalizowanej przez odwrotną transkryptazę. Z chwilą powstania dwuniciowej struktury RNA-DNA, RNaza H degradowuje nić RNA, a następnie odwrotna transkryptaza katalizuje syntezę drugiej nici DNA. Kolejny etap (transkrypcja *in vitro*), odbywa się dzięki obecności sekwencji promotorowej rozpoznawanej przez polimerazę RNA na 5'-końcach starterów 1 i 2. W ciągu 15 minut trwania tego procesu następuje  $10^5$ -krotne powielenie wyjściowego materiału. Jeśli jednak synteza równomolowych ilości sensownej i antysensownej nici RNA jest niepożądana (tak jest w większości eksperymentów), to tylko starter 2 powinien posiadać na 5'-końcu sekwencję promotorową.

W ten sposób można specyficznie powielać RNA o tej samej sekwencji co wyjściowy, jednakże końcowa wydajność procesu jest niższa.

Obie te metody stosowano z powodzeniem w eksperymentach selekcji *in vitro*. Za pomocą metody I można otrzymać znaczne ilości zarówno RNA jak i DNA. Metoda II (izotermiczna) jest szybsza i mniej skomplikowana, ale umożliwia powielanie tylko RNA, a wydajność procesu jest o kilka rzędów niższa. Ponieważ Taq polimeraza DNA oraz odwrotna transkryptaza nie wykazują zdolności naprawczych w stosunku do nukleotydów błędnie wprowadzonych do nowo syntetyzowanego DNA, w populacji cząsteczek powstających w wyniku reakcji katalizowanych przez te enzymy może nastąpić dodatkowe zróżnicowanie sekwencji ligandów.

Zależnie od warunków, w jakich prowadzona jest selekcja (temperatura, warunki jonowe), trzy kluczowe etapy selekcji *in vitro* mogą być wielokrotnie powtarzane (nawet 20-krotnie). Cząsteczki otrzymywane w każdym kolejnym cyklu tworzą nową bibliotekę



Ryc. 3. Powielanie metodą izotermiczną.

kombinatoryczną wykazującą coraz mniejszą różnorodność sekwencyjną i coraz większe powinowactwo do cząsteczek docelowych. Na zakończenie całego procesu przeprowadza się klonowanie i sekwencjonowanie DNA. To z kolei umożliwia dalsze badania, takie jak: modelowanie komputerowe struktury II- i III-rzędowej, analiza krystalograficzna, analiza NMR, badanie selektywności oddziaływań, badanie miejsca wiązania aptameru oraz jego zdolności inhibitorowych.

### III. Aptamery dla wybranych białek wirusowych

Opracowanie metody selekcji *in vitro* umożliwiło poszukiwania aptamerów o potencjalnym działaniu terapeutycznym. Turk i Gold jako jedni z pierwszych [9] zastosowali tę metodę do otrzymania aptameru RNA wiążącego się z polimerazą DNA z faga T4. Polimeraza ta wiąże się w warunkach *in vivo* z fragmentem sekwencji Shine'a-Dalgarno swojego własnego mRNA. Rozpoczynając od początkowej populacji  $10^4$  ligandów i stosując procedurę selekcji cząsteczek poprzez filtrację kompleksów RNA-polimeraza DNA za pomocą filtrów nitrocelulozowych, autorzy przeprowadzili 4 cykle selekcji. Analiza sekwencji nukleotydowej wyizolowanych aptamerów wykazała, że otrzymano dwa oligonukleotydy o wysokim powinowactwie do polimerazy DNA: jeden o takiej sekwencji jak naturalna, znaleziona w fagowym mRNA oraz drugi o zupełnie innej sekwencji, ale o identycznej stałej dysocjacji  $K_d$  kompleksu aptamer-enzym.

#### III-1. Aptamery dla odwrotnych transkryptaz

Pierwsze udane eksperymenty selekcji *in vitro* zachęciły wielu badaczy do poszukiwania w ten sposób specyficznych inhibitorów białek wirusa HIV. Przedmiotem zainteresowania stały się m.in. enzymy biorące udział we wczesnym etapie infekcji wirusem HIV, takie jak odwrotna transkryptaza oraz integraza.

Stosowane obecnie jako leki inhibitory odwrotnej transkryptazy, takie jak 3'-azydodeoksytymidyna (AZT), dideoksytydina (ddC) lub dideoksytymidyna (ddT) nie są w pełni skuteczne, gdyż pojawiają się nowe szczepy wirusa HIV odporne na działanie tych związków. Ponadto, związki te wykazują znaczną toksyczność. Dlatego w zespole Golda rozpoczęto w 1992 r. poszukiwania alternatywnego inhibitora [19]. Odwrotna transkryptaza wykazuje powinowactwo do dwóch rodzajów RNA: do tRNA<sup>Lys</sup>, którego fragment jest starterem inicjującym syntezę DNA, oraz do wirusowego mRNA stanowiącego matrycę do syntezy. Selekcję rozpoczęto od utworzenia biblioteki fragmentów RNA, w których 32 pozycje były zdegenerowane. Utworzono dwie populacje cząsteczek, z których tylko jedna zawierała sekwencję pętli antykodonowej



tRNA<sup>Lys</sup>, odpowiedzialną za wiązanie się do enzymu. Przeprowadzono 9 cykli selekcji. Zarówno z pierwszej jak i z drugiej populacji cząsteczek wyizolowano równie efektywne aptamery.

Motywy strukturalnym najczęściej powtarzającym się wśród wyselekcjonowanych oligonukleotydów był tzw. *pseudowęzeł* RNA (ang. *pseudoknot*). Aptamery zawierające tę strukturę charakteryzowały się wysokim powinowactwem do HIV RT ( $K_d \sim 5$  nM). Stwierdzono, że wiążą się one z domeną odwrotnej transkryptazy wirusa HIV, która jest odpowiedzialna za wiązanie startera. Dla przeprowadzenia testów sprawdzających właściwości inhibitorowe wyselekcjonowanych cząsteczek, został wybrany aptamer o sekwencji: UCAAGAAUCCGUUUUCAGUCGG-GAAAACUGAACAA. Stwierdzono, że hamuje on polimerazową aktywność odwrotnej transkryptazy wirusa HIV już przy stężeniu 20 nM. Co więcej, aptamer ten jest wysoce selektywny, o czym świadczy fakt, że nie hamuje on aktywności odwrotnej transkryptazy wirusa ptasiej białaczki (AMV RT) oraz odwrotnej transkryptazy wirusa białaczki Moloney'a (MMLV RT). Istnieje opinia, że prawdopodobieństwo uodpornienia się wirusa na działanie takiego aptameru jest niewielkie, ponieważ ta domena enzymu, która uczestniczy w kontaktach ze starterem nie powinna podlegać mutacjom. Można więc przypuszczać, że opisane wyżej aptamery mogą skutecznie hamować aktywność odwrotnej transkryptazy wirusa HIV.

Odwrotna transkryptaza jest enzymem, który rozpoznaje jako matrycę również DNA. Dlatego podjęto poszukiwania aptameru dla tego białka także wśród cząsteczek o strukturze jednoniciowego DNA [24]. Stosując metodę selekcji wyizolowano oligodeoksyrybonukleotydy o wysokim powinowactwie do odwrotnej transkryptazy wirusa HIV-1 ( $K_d = 1-11$  nM) i zdolności do specyficznego hamowania jej aktywności polimerazowej ( $K_i = 0,3-62$  nM). Strukturę wyselekcjonowanych ligandów określono za pomocą algorytmu Davisa i algorytmu wyznaczającego najmniejszą energię swobodną cząsteczki [24]. Na tej podstawie wyróżniono sześć grup ligandów, wśród których nie stwierdzono powtarzającego się wspólnego motywu odpowiedzialnego za wysoce specyficzne oddziaływanie z enzymem.

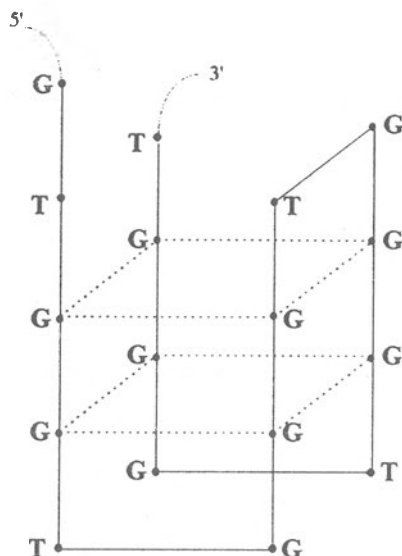
W roku 1994 wyselekcjonowano aptamery RNA dla odwrotnych transkryptaz wirusa ptasiej białaczki oraz wirusa białaczki Moloney'a [20]. Wymagało to 12 cykli selekcji z biblioteki zawierającej fragmenty oligorybonukleotydowe, w których trzy 12-nukleotydowe regiony o zdegenerowanej sekwencji były oddzielone od siebie fragmentami o zdefiniowanej sekwencji. Końcowym produktem były aptamery RNA tworzące z białkiem odwrotnej transkryptazy trwałe kompleksy o stałej dysocjacji  $K_d = 0,5-7,3$  nM. Cząsteczki o największym powinowactwie do AMV RT miały strukturę *podwójnej szpilki do włosów* (ang. *double hairpin*). Natomiast ligandy, wykazujące najwyższe powinowa-

ctwo do MMLV RT miały strukturę *trzon-pętla z wewnętrznym uwypukleniem* (ang. *stem-loop with internal bulge*). Badania nad hamowaniem aktywności polimerazowej obu transkryptaz przez wyselekcjonowane ligandy wykazały, że aptamer dla AMV RT ( $IC_{50} = 25$  nM) hamuje również aktywność transkryptazy MMLV RT ( $IC_{50} = 120$  nM). Świadczy to o jego niewielkiej specyficzności. Znacznie wyższą aktywność i specyficzność wykazywał natomiast aptamer wyselekcjonowany dla transkryptazy MMLV RT ( $IC_{50} = 9$  nM).

Porównując oligorybonukleotydowe aptamery dla HIV RT, AMV RT i MMLV RT zaobserwowano między nimi pewne podobieństwo strukturalne: wśród cząsteczek wyselekcjonowanych dla każdego z tych enzymów często występują ligandy o strukturze *pseudowęzła*. Przypuszcza się, że jest to spowodowane podobieństwami, jakie istnieją w strukturze trzeciorzędowej tych trzech transkryptaz.

### III-2. Aptamery dla innych białek

Integraza (IN) katalizuje jedną z kluczowych reakcji w cyklu życiowym wirusa, mianowicie integrację wirusowego DNA z DNA gospodarza. Wśród ludzkich białek brak jest odpowiednika tego enzymu i dlatego stanowi on bardzo dobry cel interwencji terapeutycznej. P o m m i e r i w s p. stwierdzili, że oligodeoksyrybonukleotyd posiadający w swojej sekwencji deoksytymidynę i deoksyguanozynę d[GTGGTGGG-TGGGTGGGT] oraz tworzący strukturę tetrapleksu (Ryc. 4) może selektywnie hamować katalityczną aktywność integrazy wirusa HIV-1 ( $IC_{50} = 55$  nM) [25]. Za efekt inhibicji odpowiedzialne są dwie tetrazy G (ang. *G tetrads*), jak również nukleotydy znajdujące się w pętli. Stopień inhibicji wzrasta, jeżeli w środowisku reakcji znajdują się jony  $Mg^{2+}$  lub  $Mn^{2+}$ . Aptamer ten hamuje zarówno odcinanie oligonukleotydu przez integrazę (ang. *oligonucleotide cleavage* lub *3'-processing*) jak i przeniesienie nici (ang. *strand transfer*)



Ryc. 4. III-rzędowa struktura tetrapleksowa aptameru integrazy wirusa HIV-1 [20]. Linia przerywana oznacza tetradę G.

poprzez silne wiązanie się z N-terminalną domeną enzymu tworzącą motyw palca cynkowego. Selektywność działania aptameru została określona na podstawie eksperymentów porównawczych z zastosowaniem różnych integraz retrowirusowych: HIV-2 ( $IC_{50} = 90nM$ ), FIV ( $IC_{50} = 175nM$ ), SIV ( $IC_{50} = 420nM$ ).

Ostatnio opisano również oligorybonukleotydowe aptamery dla takich białek regulatorowych wirusa HIV jak Tat i Rev. Białko Tat poprzez wiązanie się ze swoistą sekwencją wirusowego RNA zwaną TAR (ang. *Trans Activation Response region*) przyspiesza około 100-krotnie transkrypcję prowirusa katalizowaną przez komórkową polimerazę RNA klasy II. W 1995 roku za pomocą selekcji *in vitro* wyizolowano oligorybonukleotydowe aptamery dla białka Tat [26]. Przeprowadzono 11 cykli selekcji, w wyniku czego wyizolowano 64 ligandy. Analiza porównawcza sekwencji tych oligonukleotydów pozwoliła podzielić je na dwie grupy, przy czym ligandy należące do pierwszej grupy zawierały fragment o sekwencji zbliżonej do naturalnej sekwencji regionu TAR RNA.

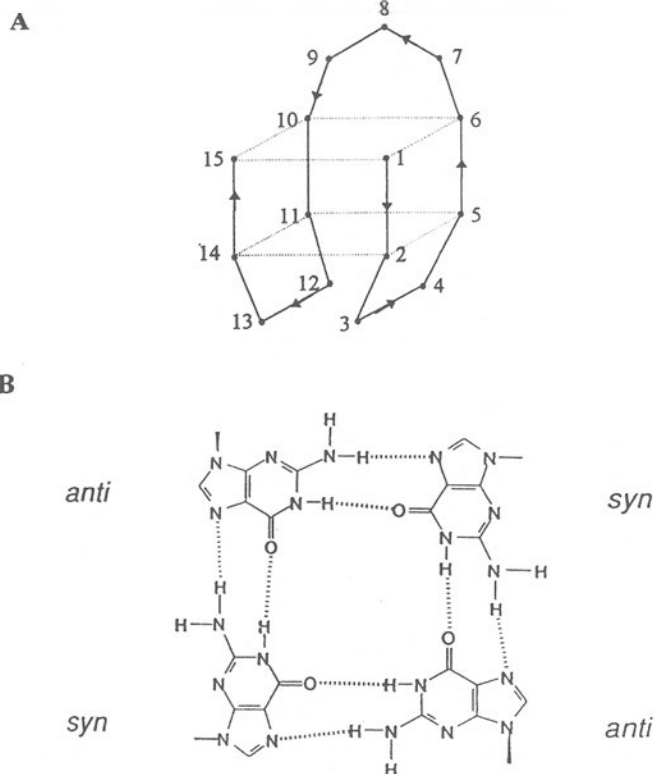
Białko regulatorowe Rev indukuje w komórce syntezę strukturalnych i enzymatycznych białek wirusowych. E l l i n g t o n i w s p. podjęli próbę znalezienia aptameru białka Rev w oparciu o sekwencję nukleotydową tzw. minimalnego elementu wiążącego Rev (ang. *Rev-binding element – RBE*) występującego w naturze [27]. Spośród dwóch populacji oligorybonukleotydów o sekwencji zbliżonej do sekwencji elementu RBE, wyselekcjonowano ligandy o 10-krotnie wyższym powinowactwie do białka Rev niż powinowactwo, jakie wykazuje naturalny fragment RBE. Wszystkie aptamery z populacji pierwszej posiadały charakterystyczny motyw strukturalny *trzon-wewnętrzna pętla-trzon* (ang. *stem-internal loop-stem*), występujący także w RBE. W aptamerach pochodzących z drugiej puli, wiele razy powtarzała się sekwencja  $CUC(N)_{1-5}GAG$  nieobecna w naturalnie występującym elemencie. W dalszych badaniach wykorzystano dwa aptamery, które nie wykazywały podobieństwa do naturalnego RBE ani pod względem sekwencji, ani pod względem struktury drugorzędowej [28]. Badania kompleksu aptamer-peptyd Rev, przeprowadzone za pomocą magnetycznego rezonansu jądrowego wykazały, że powstawanie tego kompleksu jest związane z oddziaływaniami bogatego w argininę fragmentu peptydu Rev z dużą bruzdą dwuniciowego fragmentu RNA [29].

#### IV. Aptamery dla wybranych białek krwi

Obserwowany obecnie rozwój chorób układu krążenia skłania wiele ośrodków naukowych do podjęcia prac nad poszukiwaniem nowych strategii terapeutycznych. Interesującym obiektem badań jest m.in. trombina-proteaza związana z procesem krzepnięcia krwi. Zahamowanie jej aktywności blokuje konwersję fibry-

rynogenu do fibryny. Pomimo braku informacji o oddziaływaniach kwasów nukleinowych z trombiną, Toole i wsp. podjęli prace nad poszukiwaniem aptameru o strukturze oligodeoksyrybonukleotydu, który wiązałby się z tym białkiem i hamował jego aktywność [18]. Rozpoczynając od populacji 96-nukleotydowych cząsteczek o 60 zdegenerowanych pozycjach, przeprowadzono 5 cykli selekcji. Spośród 32 analizowanych oligomerów, w 28 znaleziono sekwencję  $GGNTGG(N)_{2-5}GGNTGG$ , natomiast pozostałe 4 posiadały tylko jedno powtórzenie  $GGNTGG$ . Stała dysocjacji  $K_d$  kompleksu aptamer-trombina wynosiła ok. 200 nM. Stwierdzono, że jeden z aptamerów o takiej strukturze powodował trzykrotne wydłużenie czasu krzepnięcia, natomiast syntetyczny oligonukleotyd o sekwencji  $d[GGTGGTGTGGTGG]$  wydłużał ten czas siedmiokrotnie. Stała  $IC_{50}$  dla tego 15-meru miała wartość 25 nM.

Analiza struktury II-rzędowej tego syntetycznego oligodeoksyrybonukleotydu, przeprowadzona za pomocą dwuwymiarowego magnetycznego rezonansu jądrowego wykazała obecność tetrapleksu [30-31]. Stwierdzono, że aptamer trombiny przyjmuje symetryczną strukturę, składającą się z dwóch tetrad guaninowych i trzech pętli. Wykazano, że reszty dG w każdej tetradzie są ułożone względem siebie *syn-anti-syn-anti*, przy czym cztery fragmenty oligonukleotydu tworzące tetrapleks są ułożone antyrównolegle w stosunku do siebie (Ryc. 5). Badania krystalograficzne [32] potwierdziły, że jednoniciowy DNA w kompleksie z ludzką  $\alpha$ -trombiną tworzy strukturę tetrapleksową złożoną



Ryc. 5. A — III-rzędowa struktura tetrapleksowa aptameru trombiny  $d[G_1G_2T_3T_4G_5G_6T_7G_8T_9G_{10}G_{11}T_{12}T_{13}G_{14}G_{15}]$  [26]. Linia przerywana oznacza tetradę G. B — Wiązania wodorowe w tetradzie G.

z dwóch tetrad G, w których reszty guaninowe oddziałują między sobą poprzez wiązania wodorowe typu Hoogsteen'a.

W dalszych badaniach Bolton i wsp. określili III-rzędową strukturę kompleksu trombina-aptamer oligodeoksyrybonukleotydowy [33]. Częsteczka aptameru wiąże się z obdarzoną ładunkiem dodatnim domeną trombiny odległą od jej centrum aktywnego i w efekcie nieznacznie zmienia swą konformację. Stosując metodę chemicznej modyfikacji DNA oraz oznaczanie siły wiązania na fazie stałej (ang. *solid-phase binding assay*), określano dokładnie miejsce wiązania się 15-meru z trombiną i udział poszczególnych aminokwasów w tym wiązaniu [34]. Silnie zaangażowane w oddziaływanie z aptamerem są Lys-21 oraz Lys-65. Wiadomo, że obie te reszty aminokwasowe biorą udział w wiązaniu fibrynogenu przez trombinę [35]; ich wiązanie się z aptamerem powoduje więc inhibicję kompetycyjną — zaburza powstawanie aktywnego kompleksu fibrynogen-trombina i powoduje zahamowanie procesu krzepnięcia. Za pomocą ukierunkowanej mutagenyzy otrzymano zmutowane cząsteczki trombiny i stwierdzono, że ważną rolę w oddziaływaniach z aptamerem spełniają także Arg-70, His-66, Tyr-71 oraz Arg-73 [36-37]. Wszystkie te aminokwasy znajdują się w domenie wiążącej fibrynogen w tzw. *miejscu egzo-I* (ang. *exosite I*).

Pozytywne wyniki badań *in vitro* pozwoliły na rozpoczęcie następnego etapu: badań *in vivo*, które przeprowadzono na małpach z rodzaju makak [38]. Po infuzji aptameru do krwiobiegu zaobserwowano efekt antykoagulacyjny z *plateau* osiągniętym po 10 min. Stwierdzono również liniową zależność pomiędzy ilością podawanego aptameru a przedłużeniem okresu półtrwania protrombiny w osoczu. W 10 minut po zakończeniu infuzji okres półtrwania portrombiny wrócił do normy i na tej podstawie określono czas, po jakim następuje w warunkach *in vivo* 50%-owa degradacja aptameru (ok. 108 s). W eksperymentach *ex vivo* obserwowano wpływ aptameru na zahamowanie agregacji płytek krwi indukowanej przez trombinę, podczas gdy ten sam aptamer nie miał wpływu na agregację płytek indukowaną kolagenem. Świadczy to o specyficzności działania aptameru i o specyficzności jego wiązania się z określonym fragmentem cząsteczki trombiny.

W wielu ośrodkach badawczych poszukiwano oligonukleotydowych aptamerów trombiny i stwierdzono, że wszystkie wyizolowane metodą selekcji *in vitro* cząsteczki DNA wykazujące powinowactwo do tego białka tworzyły struktury tetrapleksowe [18, 34, 36-37, 39-42]. Zaobserwowano też, że fragmenty RNA o sekwencji analogicznej do sekwencji aptamerów trombiny o strukturze DNA nie wykazały właściwości aptamerycznych. Aptamery trombiny o strukturze RNA miały inne właściwości oraz inną strukturę I- i II-rzędową [43]. Z kombinatorycznej biblioteki, zawierającej oligomery o długości ok. 100 nukleotydów, wyizolowano

po 12 cyklach selekcji oligorybonukleotydy o najwyższym powinowactwie do trombiny. Następnie sekwencja została skrócona do 24-meru otrzymanego drogą chemicznej syntezy. Budowę tego aptameru określono jako strukturę *pętli z trzonem* (ang. *stem-loop*) z 16-nukleotydowym odcinkiem w pętli i 4-nukleotydowym w trzonie. Najistotniejsze dla oddziaływań z trombiną są nukleotydy występujące w pętli. Miejscem wiązania się aptameru do białka jest obdarzona ładunkiem ujemnym domena wiążąca heparynę, tzw. *miejsce egzo-II* (ang. *exosite II*). Eksperymenty określające wpływ tego oligonukleotydu na proces konwersji fibrynogenu do fibryny wykazały, że 50%-owy efekt inhibitorowy występuje przy 200 nM stężeniu ( $IC_{50} = 200$  nM), przy czym hamowanie tej reakcji ma charakter niekompetycyjny.

Aptamery o strukturze DNA i RNA hamują więc aktywność trombiny z różną efektywnością oraz poprzez dwa różne mechanizmy: kompetycyjny (DNA), bądź niekompetycyjny (RNA), o czym świadczą podane wyżej wartości współczynnika  $IC_{50}$ . Przyczyną tego zróżnicowania są prawdopodobnie różne struktury II-rzędowe tych aptamerów oraz odrębne miejsca ich wiązania się do trombiny.

Zaletą w badaniach *in vivo* nad aptamerami trombiny jest występowanie docelowego białka poza komórką, w związku z czym cząsteczki aptamerów nie muszą pokonywać istotnej przeszkody, jaką jest błona komórkowa. Podobnie jest w przypadku aptameru selektyny L - białka, które uczestniczy w rozwoju stanu zapalnego poprzez wiązanie się z leukocytami i udział w ich migracji do tkanek. Związki o strukturze węglowodanowej, stosowane dotychczas jako inhibitory selektyny wykazują jednak stosunkowo niskie powinowactwo do tego białka. W 1996 roku za pomocą selekcji *in vitro* wyizolowano oligonukleotydowe aptamery dla selektyny L [43]. Otrzymane cząsteczki o strukturze jednoniciowego DNA wykazywały wysokie powinowactwo do selektyny L ( $K_d \sim 1$  nM) — ok. 100 razy wyższe niż znaleziony wcześniej naturalny inhibitor węglowodanowy. Co więcej, były one również wysoce selektywne; wiązanie się otrzymanego aptameru z selektyną L było ok. 200-600 razy silniejsze niż jego wiązanie się z selektyną E i ok.  $10^4$  razy silniejsze niż z selektyną P. Stwierdzono ponadto, że w warunkach *in vitro* aptamer hamuje wiązanie się selektyny L z naturalnym inhibitorem węglowodanowym ( $IC_{50} = 3$  nM). Przed rozpoczęciem badań *in vivo* wybrany ligand, w celu zwiększenia jego stabilności we krwi, został chemicznie zmodyfikowany zarówno na 5'-jak i na 3'-końcu. Modyfikacja 5'-końca polegała na przyłączeniu reszty glikolu polietylenowego (PEG) o masie cząsteczkowej 20 kDa. Natomiast modyfikacja 3'-końca ligandu polegała na połączeniu jego wolnej funkcji 3'-hydroksylowej wiązaniem internukleotydowym (3'-3') z dodatkową resztą tymidyny zawierającej w pozycji C6 grupę  $CH = C(O)NH(CH_2)_6NHCOCF_3$  (ang. *Amino Modifier C6 dT*) [44]. Dzięki temu okres

półtrwania ( $t_{1/2}$ ) tego oligonukleotydu w osoczu zwiększył się do 18 min. Stwierdzono, że po dożylnym podaniu myszom aptamery blokowały migrację ludzkich limfocytów do tkanki limfoidalnej w sposób zależny od dawki.

## V. Aptamery zawierające modyfikacje chemiczne

pozytywne wyniki badań *in vivo* pozwalają mieć nadzieję na szybki postęp w pracach nad zastosowaniem aptamerów w terapii. Jednakże główną przeszkodą może się tu okazać nieefektywny transport oligonukleotydów przez błony komórkowe oraz mała oporność naturalnych oligonukleotydów na działanie enzymów nukleolitycznych. Warunkiem skutecznego działania tych połączeń jest ich trwałość w płynach ustrojowych i we wnętrzu komórek. Ich oporność na działanie nukleaz można zwiększyć poprzez podstawienie jednego z niemoistkowych atomów tlenu grupy fosforanowej atomem siarki lub grupą metylową [45, 46]. Jednakże oligonukleotydy o zmodyfikowanym szkieletcie fosforanowo-cukrowym nie mogą być obiektem selekcji *in vitro*, ponieważ powielanie materiału w tym procesie następuje wskutek reakcji enzymatycznych, a stosowane polimerazy nie posiadają zdolności syntezy oligonukleotydów zawierających takie modyfikacje w każdym wiązaniu internukleotydowym. Można jednak zastosować jako substraty dla polimeraz trifosforany niektórych zmodyfikowanych nukleozydów, np. trifosforany cytydyny i urydyny zawierające zamiast grupy 2'-hydroksylowej (-OH) grupę aminową (-NH<sub>2</sub>).

Populacja cząsteczek RNA zawierających tak zmodyfikowane jednostki nukleozydowe została wytworzona w celu wyizolowania aptamerów dla ludzkiej elastazy neutrofilowej — HNE (ang. *human neutrophil elastase*) [47]. Jest to proteaza serynowa, która podlega sekrecji w odpowiedzi na działanie czynników zapalnych. W normalnych warunkach enzym ten uczestniczy w degradacji i fagocytozie chorobotwórczych bakterii, natomiast jego nadmiar jest związany z wieloma chorobami, takimi jak np. samoistna rozedma płucna, zespół ostrego wyczerpania oddechowego dorosłych, chroniczny bronchit czy mukowiscydoza. Zmodyfikowane cząsteczki RNA, otrzymane po 15 cyklach selekcji *in vitro*, były bogate w reszty guanozyny. Na podstawie degradacji enzymatycznych za pomocą RNazy T1 oraz elektroforezy na żelu poliakrylamidowym w warunkach niedenaturujących stwierdzono, że tworzyły one wewnątrzcząsteczkowe struktury tetrapleksowe. Okres ich półtrwania w osoczu ( $t_{1/2}$ ) wzrósł do około 20 godzin (dla porównania — okres półtrwania niemodyfikowanych oligoribonukleotydów o takiej samej sekwencji wynosił 4 min.). Stała dysocjacji  $K_d$  kompleksów aptamer-elastaza wynosiła ok. 70 nM. Jednakże, pomimo tworzenia stabilnego kompleksu zmodyfikowane li-

gandy nie hamowały aktywności elastazy, podobnie jak aptamer o strukturze DNA wykazujący wysokie powinowactwo do enzymu ( $K_d = 15$  nM) [48]. Efektywnym inhibitorem elastazy okazał się natomiast ten sam oligodeoksyrybonukleotyd kowalencyjnie połączony z tetrapeptydem N-metoksybursztynilo-Ala-Ala-Pro-Val, który już wcześniej był znany jako słaby inhibitor kompetycyjny elastazy. Wyżej wymieniony koniugat okazał się 5-krotnie silniejszym inhibitorem enzymu niż sam tetrapeptyd [48]. Kowalencyjne połączenie tego samego oligodeoksyrybonukleotydu z fluoresceiną może z kolei znaleźć praktyczne zastosowanie w diagnostyce chorób związanych z podwyższonym poziomem elastazy [49]. W wykrywaniu elastazy koniugat aptamer-fluoresceina okazał się równie efektywny jak przeciwciała monoklonalne anty-HNE.

W poszukiwaniach efektywnego inhibitora elastazy zespół Smitha [50, 51] zastosował zmodyfikowaną metodę selekcji ligandów. Modyfikacja ta polegała na dodaniu do preparatu oligomerów o zdegenerowanych sekwencjach (tzn. preparatu stanowiącego kombinatoryczną bibliotekę fragmentów DNA) oligonukleotydu kowalencyjnie związanego z waliną, a jednocześnie komplementarnego do określonego fragmentu łańcucha wspólnego dla oligodeoksyrybonukleotydów tworzących bibliotekę. Dzięki temu aptamer wyselekcjonowany z tej biblioteki składa się z dwóch oligonukleotydów i zawiera w swej cząsteczce fragment o strukturze dwuniciowej. Tak wyizolowane aptamery wykazują wysoką selektywność w rozpoznawaniu elastazy. Stwierdzono jednocześnie, że miejsce wiążące aptamer wykazuje stereoselektywność, ponieważ aptamer zawierający L-walinę ( $IC_{50} \sim 20$  nM) jest 4-krotnie silniejszym inhibitorem elastazy niż jego analog zawierający D-walinę.

Kombinatoryczna biblioteka zawierająca cząsteczki RNA zmodyfikowane w pozycji 2' grupą aminową została utworzona w celu wyselekcjonowania stabilnego aptameru dla zasadowego czynnika wzrostu fibroblastów (bFGF) [52], który uczestniczy w procesie angiogenezy. Rozwój nowych naczyń krwionośnych rzadko występuje u zdrowych dorosłych osób, jednakże ma miejsce w pewnych stanach patologicznych, takich jak np. łuszczyca, reumatoidalne zapalenie stawów, retinopatia cukrzycowa, czy rozwój nowotworu. Metodą selekcji *in vitro* wyizolowano cząsteczki o wysokim powinowactwie do bFGF. Pomimo obecności czterech par guanozyny, wykluczono możliwość tworzenia struktury tetrapleksowej przez otrzymane aptamery. Stała dysocjacji  $K_d$  dla najbardziej aktywnych aptamerów wynosiła ok. 0,35 nM. Ligandy te były około 1000 razy bardziej stabilne w 90% surowicy ludzkiej niż naturalny RNA. W porównaniu z pięcioma innymi białkami z rodziny FGF wykazywały one wysoką specyficzność w stosunku do bFGF. Dane te wskazują, że pomimo różnych sekwencji zmodyfikowane aptamery wykazują równie wysokie powinowactwo i specyficzność w stosunku do bFGF jak natural-

ne, niemodyfikowane cząsteczki wyselekcjonowane metodą SELEX [53]. W eksperymencie z komórkami CHO wykazano, że zmodyfikowane aptamery hamują wiązanie się czynnika bFGF z jego receptorem na powierzchni tych komórek; 50%-owe zahamowanie aktywności bFGF obserwowano już przy 1-3 nM stężeniu aptameru. Ponieważ indukcja migracji komórki śródbłonna ma zasadnicze znaczenie w procesie angiogenezy, zbadano również wpływ aptameru dla bFGF na migrację komórek śródbłonna aorty wołu (BAE, ang. *bovine aorta endothelial cells*). Stwierdzono, że proces ten jest hamowany w 50% już przy jego 50 nM stężeniu. Aptamer dla bFGF użyty w stężeniu 50 nM hamuje także proliferację ludzkich komórek śródbłonna żyły pępowinowej (HUVEC, ang. *human umbilical vein endothelial cells*).

W badaniach nad aptamerem trombiny Toole i w s p. wykorzystali kombinatoryczną bibliotekę składającą się również ze zmodyfikowanych oligorybonukleotydów [42]. Do ich syntezy użyto trzy naturalne nukleotydy A, G i C oraz jeden zmodyfikowany: 5-(1-pentynylo)-2'-deoksyurydyne. Stosując taką samą metodę selekcji jak poprzednio [18], po 6 cyklach otrzymano aptamery zawierające zmodyfikowane zasady. Ich wiązanie się do trombiny i hamowanie jej aktywności w bardzo dużym stopniu zależało od obecności zmodyfikowanej zasady, ponieważ ligand o tej samej sekwencji zasad zawierający urydyne zamiast 5-(1-pentynylo)-2'-deoksyurydyny był całkowicie pozbawiony właściwości aptamerycznych wobec trombiny [42].

Tiofosforanowe analogi oligonukleotydów także mogą wykazywać właściwości aptameryczne. Wyatt i w s p. poddali odpowiednim testom tiofosforanowe analogi wszystkich możliwych oktanukleotydów i stwierdzili, że oktamer d[TTGGGGTT] hamuje proces namnażania się wirusa HIV [54]. Cztery cząsteczki tego oligonukleotydu tworzą tzw. tetrapleks równoległy. Zdolność do tworzenia tetrapleksu oraz obecność szkieletu tiofosforanowego wydają się być warunkiem koniecznym dla uzyskania aktywności przeciwwirusowej przez tę cząsteczkę, która wiąże się z pętlą V3 białka gp 120 wirusa HIV.

W innych badaniach wykazano, że tiofosforanowe analogi okta- i heptanukleotydów, również bogate w reszty deoksyguanozyny, mogą hamować w warunkach *in vitro* polimeryzację DNA katalizowaną przez polimerazę DNA z faga T7 albo przez odwrotną transkryptazę wirusa ptasiej białaczki [55]. Spośród tych fragmentów DNA najsilniejszy efekt inhibitorowy wykazywały oligomery zawierające 8 nukleotydów, w tym cztery następujące po sobie reszty deoksyguanozyny. Tiofosforanowe oligonukleotydy użyte w stężeniu 0,13-0,25  $\mu\text{M}$  hamowały aktywność AMV RT, natomiast w stężeniu 1-2,5  $\mu\text{M}$  hamowały aktywność fagowej polimerazy DNA. Zamiana którejkolwiek reszty deoksyguanozyny na inny nukleotyd całkowicie likwidowała właściwości inhibitorowe oligomerów.

Pomiar temperatury mięknienia ( $T_m$ ) oraz elektroforeza na żelu poliakrylamidowym w warunkach niedenaturujących dowiodły istnienia polimerycznych struktur wyższego rzędu, które prawdopodobnie są odpowiedzialne za efekt inhibitorowy tych oligonukleotydów. Niewielka efektywność działania tych aptamerów może wynikać z faktu, że były to zaledwie oktanukleotydy.

Niezależne badania przeprowadzone przy użyciu dłuższych fragmentów DNA wykazały, że tiofosforanowy oligonukleotyd o sekwencji d[AGATGTTTGA-GCTCT] może hamować aktywność odwrotnej transkryptazy AMV przy znacznie niższym stężeniu, przy czym jego efektywność zależy od konfiguracji absolutnej na atomach fosforu tiofosforanowych wiązań internukleotydowych: izomer all- $S_p$  użyty w stężeniu 400 nM powoduje 70% zahamowanie aktywności enzymu, natomiast izomer all- $R_p$  powoduje tylko 30% obniżenie aktywności AMV RT [56]. Z kolei izomer all- $R_p$  oligonukleotydu d[AAGCATACGGGGTGT] zawierającego 4 następujące po sobie reszty deoksyguanozyny, w 90% hamuje aktywność AMV RT już przy stężeniu 60 nM, podczas gdy izomer all- $S_p$  powoduje w tych warunkach zaledwie 10% zahamowanie aktywności tego enzymu [56].

## VI. Aptamery dla przeciwciał

Zainteresowanie aptamerami dla przeciwciał jest związane z poszukiwaniami sposobów leczenia chorób autoimmunizacyjnych. Pierwsza wzmianka o oddziaływaniach przeciwciał z kwasami nukleinowymi pochodzi z prac Schwartz'a i Stollara [57], którzy jednak nie przeprowadzili szczegółowej analizy obserwowanych interakcji DNA-przeciwciała. W 1986 roku opisano autoprzeciwciała wiążące tRNA<sup>Met</sup> i snRNA U1 pochodzące z komórek HeLa [58]. Wyniki te dały podstawę do przypuszczeń, że RNA może funkcjonować jako epitop w stosunku do tych domen przeciwciała, które wiążą antygen.

W następnych latach została rozwinięta strategia selekcji epitopów o strukturze RNA, rozpoznających autoprzeciwciała pozyskane od pacjentów z zespołem nakładającego się liszaja (ang. *syndrom lupus-overlap*) [59]. Tsai i Keene, stosując metodę selekcji ligandów, otrzymali również epitopy RNA skierowane przeciwko autoprzeciwciałom powodującym układowy toczeń rumieniowaty (SLE, ang. *systemic lupus erythematosus*) [60]. Po trzech cyklach procesu wyselekcjonowano oligorybonukleotydy, które swoją sekwencją oraz strukturą II- i III-rzędową przypominały naturalne regiony występujące w cząsteczkach snRNA U1 (ang. *small nuclear RNA U1*, niskocząsteczkowy jądrowy RNA bogaty w reszty urydyny). Eksperymenty kompetycyjne potwierdziły, że wyizolowane ligandy hamują oddziaływanie autoprzeciwciał z snRNA U1. Wyselekcjonowana cząsteczka RNA może funkcjonować zarówno jako specyficzny inhibitor oddziaływań

przeciwciało — antygen, jak i detektor obecności przeciwciał.

W 1996 roku Wiegand i wsp., stosując metodę SELEX, otrzymali oligonukleotydy, które efektywnie ( $K_d = 10 - 35$  nM) i selektywnie wiążą się z IgE [61]. Ligandy te były izolowane z trzech różnych bibliotek: dwie zawierały cząsteczki RNA, posiadające zmodyfikowane zasady ( $2'$ -aminopirymidyny), a trzecia pula zawierała cząsteczki jednoniciowego DNA. Analiza ich struktury drugorzędowej sugerowała możliwość tworzenia tetrapleksu przez cząsteczki RNA oraz struktury *pętli z trzonem* przez cząsteczki DNA. Stwierdzono, że opisane wyżej aptamery wiążą się z immunoglobulinami klasy IgE, które są odpowiedzialne za rozwój chorób alergicznych.

## VII. Aptamery dla cząsteczek o niskim ciężarze cząsteczkowym

Niektóre naturalnie występujące kwasy nukleinowe mają zdolność specyficznego wiązania się z substancjami niskocząsteczkowymi. Znane są np. oddziaływania intronów grupy I z guanozyną [62] i z L-argininą [63]. Wiadomo również, że element TAR w RNA wirusa HIV tworzy specyficzny kompleks z L-argininą [64]. Od czasu odkrycia metody selekcji *in vitro* zidentyfikowano wiele aptamerów o strukturze RNA lub DNA, które specyficznie wiążą się z cząsteczkami o niskiej masie cząsteczkowej. W ten sposób otrzymano oligonukleotydowe aptamery takich naturalnych cząsteczek jak: barwniki organiczne [10, 65]; ATP [66, 67]; alkaloidy [68]; antybiotyki aminoglikozydowe [69], czy aminokwasy (np. tryptofan [70], arginina [71-72] i walina [73]).

W oddziaływaniach oligonukleotyd-białko mogą uczestniczyć pojedyncze aminokwasy. Wykazano, że w procesie rozpoznawania przez białko Tat regionu TAR w mRNA wirusa HIV-1 decydującą rolę odgrywa arginina znajdująca się wewnątrz zasadowej domeny Tat [74]. Tak więc izolowanie sekwencji RNA zdolnych do specyficznego rozpoznawania pojedynczych aminokwasów pozwoliłoby lepiej zbadać oddziaływania białko-kwasy nukleinowe. Poszukując aptameru dla tryptofanu zespół Szostaka [70] wykazał, że cząsteczka RNA w sposób stereospecyficzny wiąże się z D-tryptofanem, natomiast w stosunku do L-tryptofanu wykazuje około 1000 razy mniejsze powinowactwo. Podobne stereozróżnicowanie zaobserwowano dla aptameru argininy [75]. Stała dysocjacji kompleksu aptamer-arginina była  $12 \times 10^3$  razy wyższa dla enancjomeru D niż dla L. Natomiast w przypadku aptameru waliny zaobserwowano L-stereoselektywność [73]. Powyższe dane świadczą o tym, że aptamery, podobnie jak wiele enzymów, wykazują stereoselektywność w stosunku do docelowych cząsteczek.

## VIII. Podsumowanie

Podstawową cechą krótkich fragmentów RNA lub

DNA jest ich zdolność do hybrydyzacji z komplementarnymi fragmentami kwasów nukleinowych. Jednakże pojawiające się od pewnego czasu doniesienia o niespecyficznych oddziaływaniach antysensownych oligonukleotydów z białkami skłoniły wielu badaczy do poszukiwania przyczyn tego zjawiska. W ostatnich latach wykazano, że fragmenty kwasów nukleinowych o określonej sekwencji zasad mogą mieć właściwości aptameryczne, dzięki którym wiążą się silnie z białkami. Obecnie tego typu oddziaływania stanowią nową dziedzinę badań, a dzięki opracowaniu wydajnych metod chemicznej syntezy oligonukleotydów oraz metod powielania DNA i RNA w warunkach *in vitro*, wynaleziono efektywny sposób selekcji aptamerów. Z kolei znajomość metod sekwencjonowania kwasów nukleinowych oraz nowoczesne techniki analizy komputerowej i NMR umożliwiły precyzyjne badanie ich struktury, a także sposobu oddziaływania z innymi cząsteczkami. Miarą zainteresowania aptamerami i ich właściwościami jest szybko rosnąca liczba publikacji, zaś możliwość zastosowania oligonukleotydowych aptamerów w terapii lub diagnostyce wielu chorób wydaje się w pełni realna.

Artykuł otrzymano 16 marca 1998 r.

Zaakceptowano do druku 10 września 1998 r.

## Piśmiennictwo

1. Mills DR, Peterson RL, Spiegelman S (1967) *Proc Natl Acad Sci USA* **58**: 217-224
2. Oliphant AR, Brandl CJ, Struhl K (1989) *Mol Cell Biol* **9**: 2944-2940
3. Kinzler K W, Vogelstein B (1989) *Nucl Acid Res* **17**: 3645-3653
4. Kinzler K W, Vogelstein B (1990) *Mol Cell Biol* **10**: 634-642
5. Thiesen HJ, Bach C (1990) *Nucl Acid Res* **18**: 3203-3209
6. Pollok R, Triesman R (1990) *Nucl Acid Res* **18**: 6197-6204
7. Robertson DL, Joyce GF (1990) *Nature (Lond)* **344**: 467-468
8. Green R, Ellington AD, Szostak J (1990) *Nature (Lond)* **347**: 406-408
9. Tuerk C, Gold L (1990) *Science* **249**: 505-510
10. Ellington AD, Szostak JW (1990) *Nature (Lond)* **346**: 818-822
11. Kenan DJ, Tsai DE, Keene JD (1994) *TIBS* **19**: 57-64
12. Kwaśnikowski P, Markiewicz WT (1996) *Biotechnologia* **32**: 162-175
13. Cwirla SE, Peters EA, Barrett RW, Dower WJ (1990) *Proc Natl Acad Sci USA* **87**: 6378-6382
14. Scott JK, Smith GP (1990) *Science* **249**: 386-390
15. Mattheakis LC, Bhatt RR, Dower WJ (1994) *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 9022-9026
16. Hanes J, Pluckthun A (1997) *Proc Natl Acad Sci USA* **94**: 4937-4922
17. Schneider D, Tuerk C, Gold L (1992) *J Mol Biol* **228**: 862-869
18. Bock LC, Griffin LC, Latham JA, Vermaas EH, Toole J (1992) *Nature (Lond)* **355**: 564-566
19. Tuerk C, MacDougal S, Gold L (1992) *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 6988-6992
20. Chen H, Gold L (1994) *Biochemistry* **33**: 8746-8757
21. Tsai DE, Harper DS, Keene JD (1991) *Nucl Acid Res* **19**: 4931-4936
22. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA (1988) *Science* **239**: 487-491

23. Guatelli JC, Whitfield KM, Kwoh DY, Barringer K J, Richman DD, Gingeras TR (1990) *Proc Natl Acad Sci USA* **87**: 1874-1878
24. Schneider DJ, Feigon J, Hostomsky Z, Gold L (1995) *Biochemistry* **34**: 9599-9610
25. Mazumder A, Neamati N, Ojwang JO, Sunder S, Rando RF, Pommier Y (1996) *Biochemistry* **35**: 13762-13771
26. Yamamoto R, Toyota S, Viljanen P, Machida K, Nishikawa S, Murakami K, Taira K, Kumar PK (1995) *Nucl Acid Symp Ser* **34**: 145-146
27. Giver L, Bartel D, Zapp M, Pawul A, Green M, Ellington AD (1993) *Nucl Acid Res* **21**: 5509-5516
28. Symensma TL, Giver L, Zapp M, Takle GB, Ellington AD (1996) *J Virol* **70**: 179-187
29. Ye X, Gorin A, Ellington AD, Patel DJ (1996) *Nat Struct Biol* **3**: 1026-1033
30. Macaya RF, Schultze P, Smith FW, Roe JA, Feigen J (1993) *Proc Natl Acad Sci USA* **90**: 3745-3749
31. Wang KY, McCurdy S, Shea RG, Swaminathan S, Bolton PH (1993) *Biochemistry* **32**: 1899-1904
32. Padmanabhan K, Padmanabhan KP, Ferrara JD, Sadler JE, Tulinsky A (1993) *J Biol Chem* **268**: 17651-17654
33. Wang KY, Krawczyk SH, Bischofberger N, Swaminathan S, Bolton PH (1993) *Biochemistry* **32**: 11285-11292
34. Paborsky LR, McCurdy SN, Griffin LC, Toole JJ, Leung LL (1993) *J Biol Chem* **268**: 20808-20811
35. Church FC, Pratt CW, Noyes CM, Kalayanamit T, Scherril GB, Tobin RB, Meade JB (1989) *J Biol Chem* **264**: 18419-18425
36. Wu Q, Tsiang M, Sadler JE, (1992) *J Biol Chem* **267**: 24408-24412
37. Tsiang M, Jain AK, Dunn KE, Rojas ME, Leung LL, Gibbs CS (1995) *J Biol Chem* **270**: 16854-16863
38. Griffin LC, Tidmarsh GF, Bock LC, Toole JJ, Leung LL (1993) *Blood* **81**: 3271-3276
39. Griffin LC, Toole JJ, Leung LL (1993) *Gene* **137**: 25-31
40. Bracht F, Schror K (1995) *Agents Actions Suppl* **45**: 315-322
41. Bracht F, Schror K (1994) *Biochem Biophys Res Com* **200**: 933-937
42. Latham JA, Johnson R, Toole JJ (1994) *Nucl Acid Res* **22**: 2817-2822
43. Kubik MF, Stephens AW, Schneider D, Marlar RA, Tasset D (1994) *Nucl Acid Res* **22**: 2618-2626
44. Hicke BJ, Watson SR, Koenig A, Lynott CK, Bargatze RF, Chang YF, Ringquist S, Moon-McDermott L, Jennings S, Fitzwater T, Han HL, Varki N, Albinana I, Willis MC, Varki A, Parma D (1996) *J Clin Invest* **98**: 2688-2692
45. Okruszek A (1994) *Biotechnologia* **27**: 16-39
46. Koziołkiewicz M (1994) *Biotechnologia* **27**: 50-53
47. Lin Y, Qin Q, Gill SC, Jayasena SD (1994) *Nucl Acid Res* **22**: 5229-5233
48. Lin Y, Padmapriya A, Morden KM, Jayasena SD (1995) *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 11044-11048
49. Davis KA, Abrams B, Lin Y, Jayasena SD (1996) *Nucl Acid Res* **24**: 702-706
50. Smith D, Kirschenheuter GP, Charlton J, Guidot D, Repine J (1995) *Chem Biol* **2**: 741-750
51. Chalton J, Kirschenheuter GP, Smith D (1997) *Biochemistry* **36**: 3018-3026
52. Jellinek D, Green LS, Bell C, Lynott CK, Gill N, Vargeese C, Kirschenheuter G, McGee DP, Abesinghe P, Pieken WA (1995) *Biochemistry* **34**: 11363-11372
53. Jellinek D, Lynott CK, Rifkin DB, Janjin N (1993) *Proc Natl Acad Sci USA* **90**: 11227-11231
54. Wyatt JR, Vickers TA, Robertson JL, Buckheit RW Jr, Klimkait T, DeBaets E, Davis PW, Rayner B, Imbach JL, Ecker DJ (1994) *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 1356-1360
55. Tamura N, Iwatani W, Shoji Y, Shimada, Mizushima Y (1995) *Nucl Acid Symp* **34**: 93-94
56. Krakowiak A, Koziołkiewicz A (1998) *Nucleosides & Nucleotides* **17** — w druku
57. Schwartz RS, Stollar BD, (1985) *J Clin Invest* **75**: 321-327
58. Wilusz J, Keene JD (1986) *J Biol Chem* **261**: 5467-5472
59. Deutscher SL, Keene JD (1988) *Proc Natl Acad Sci USA* **85**: 3299-3303
60. Tsai DE, Keene JD (1993) *J Immunol* **150**: 1137-1145
61. Wiegand TW, Williams PB, Dreskin SC, Jouvin MH, Kinet JP, Tasset D (1996) *J Immunol* **157**: 221-230
62. Bass BL, Cech TR (1984) *Nature (Lond)* **308**: 820-826
63. Hicke BJ, Chrystian EL, Yarus M (1989) *EMBO J* **8**: 3843-3851
64. Puglisi JD, Tan R, Calnan BJ, Frankel AD, Williamson JR (1992) *Science* **257**: 76-80
65. Ellington AD, Szostak JW (1992) *Nature (Lond)* **355**: 850-852
66. Sassanfar M, Szostak JW (1993) *Nature (Lond)* **364**: 550-553
67. Huizenga DE, Szostak JW (1995) *Biochemistry* **34**: 656-665
68. Jenison RD, Gill SC, Pardi A, Polisky B (1994) *Science* **263**: 1425-1429
69. Wang Y, Rando RR (1995) *Chem Biol* **2**: 281-290
70. Famulok M, Szostak JW (1992) *J Am Chem Soc* **114**: 3990-3991
71. Connel GJ, Illangsekare M, Yarus M (1994) *Biochemistry* **33**: 5497-5502
72. Famulok M (1994) *J Am Chem Soc* **116**: 1698-1706
73. Majerfeld I, Yarus M (1994) *Struct Biol* **1**: 287-292
74. Calnan BJ, Tidor B, Biancalana S, Hudson D, Frankel AD (1991) *Science* **252**: 1167-1171
75. Geiger A, Burgstaller P, von der Eltz H, Roeder A, Famulok A (1996) *Nucl Acid Res* **24**: 1029-1036

Redakcja „*Postępy Biochemii*” chcąc uniknąć przypadków drukowania prac o podobnej tematyce prosi autorów artykułów kierowanych do naszego czasopisma o wcześniejsze informowanie o zamiarze ich napisania. Informacja obok tytułu powinna zawierać także orientacyjny spis treści. Poczynając od stycznia 1999 roku uzyskanie wstępnej akceptacji proponowanej tematyki będzie warunkiem koniecznym do przyjęcia artykułu do dalszej pracy redakcyjnej.

# Roślinne geny odporności i ich rola podczas infekcji

## Plant Resistance genes and their role during infection

MAGDALENA KRZYMOWSKA\*

### Spis treści:

- I. Wprowadzenie
- II. Roślinne geny odporności
  - II-1. Funkcje przypisywane poszczególnym domenom białek kodowanych przez roślinne geny odporności
    - II-1.1. Powtórzenia bogate w leucynę
    - II-1.2. Sekwencja wiążąca nukleotydy
    - II-1.3. Suwak leucynowy
    - II-1.4. Regiony wykazujące podobieństwo do białek Toll i receptora interleukiny 1
    - II-1.5. Domena o aktywności kinazy serynowo-treoninowej
  - II-2. Ewolucja genów *R*
- III. Zdarzenia zainicjowane rozpoznaniem obecności patogena
- IV. Reakcje obronne wspólne dla świata roślin i zwierząt

**Wykaz stosowanych skrótów:** HR — reakcja nadwrażliwości; NBS — sekwencja wiążąca nukleotydy; LRR — powtórzenia bogate w leucynę; TMV — wirus mozaiki tytoniowej; MHC — układ zgodności tkankowej; białka PR — białka indukowane podczas patogenezы; SA — kwas salicylowy; SAR — reakcja odporności wzbudzonej.

### I. Wprowadzenie

Rośliny w swoim środowisku nieustannie narażone są na kontakt z mikroorganizmami chorobotwórczymi. Jednak tylko w nielicznych przypadkach dochodzi do infekcji i rozwoju zmian chorobowych. Procesy warunkujące odporność komórek roślinnych są bardzo złożone i zależą od całej gamy reakcji, których celem jest uniemożliwienie patogenowi kolonizacji a następnie porażenia rośliny. Odpowiedź rośliny można podzielić na dwie fazy: wczesną obejmującą rozpoznanie obecności patogena i powstanie sygnału o infekcji oraz późną związaną z aktywacją mechanizmów obronnych. Decydująca różnica między reakcją rośliny odpornej i wrażliwej, jak się powszechnie uważa, dotyczy czasu koniecznego dla rozpoznania obecności patogena co pociąga za sobą uruchomienie późnych procesów. Roślina odporna zdolna jest podjąć natychmiastową i skuteczną obronę, podczas gdy reakcje rośliny wrażliwej są wolniejsze i słabsze, a tym samym niewystarczające by zahamować wzrost czy rozprzestrzenianie się patogena. Tak więc, przełamanie odporności spowodowane jest na ogół niezdolnością

### Contents:

- I. Introduction
- II. Plant resistance genes
  - II-1. Possible functions of structural domains of proteins encoded by resistance genes
    - II-1.1. Leucine-rich repeats
    - II-1.2. Nucleotide binding sequence
    - II-1.3. Leucine zipper
    - II-1.4. Regions of similarity to Toll protein and II-1 receptor
    - II-1.5. Serine-threonine kinase domain
  - II-2. Evolution of *R* genes
- III. Events triggered by perception of pathogen presence
- IV. Defense reactions common to plants and animals

rośliny do percepcji patogena a nie brakiem mechanizmów obronnych. Odporność rośliny może przejawiać się w różnych formach. Często towarzyszy jej reakcja nadwrażliwości (HR, ang. *hypersensitive response*). Polega ona na obumieraniu komórek w bezpośrednim sąsiedztwie miejsca infekcji, co ma zapobiegać dalszemu rozprzestrzenianiu się patogena.

W ostatnich trzech latach dokonano „milowego kroku” prowadzącego do wyjaśnienia procesów kontrolujących wczesne etapy odpowiedzi obronnej. Wyizolowano i scharakteryzowano geny roślinne, których produkty uczestniczą w rozpoznaniu obecności patogena. Poznano też sekwencje wielu genów wirusowych, bakteryjnych i grzybowych, których produkty sygnalizują roślinie obecność patogena. W przypadku niektórych patosystemów zaproponowano model oddziaływania produktów genów gospodarza i patogena. Jak wspomniano wcześniej, rozpoznanie infekcji jest krytyczne dla odporności rośliny. Nie należy jednak zapominać, że zapoczątkowuje ono złożoną kaskadę reakcji, których regulacja a także znaczenie jest ciągle jeszcze słabo poznane. Tak więc dopiero odkrycie mechanizmów rządzących późną fazą odpowiedzi obronnej pozwoli na stworzenie kompletnego modelu oddziaływań patogen-roślina.

### II. Roślinne geny odporności

Już na początku XX wieku hodowcy zauważyli, że cecha odporności jest dziedziczna i segreguje zgodnie z prawami Mendla. Fakt ten wykorzystywano z powodzeniem do selekcji odpornych odmian zbóż, w tym

\* Dr, Instytut Biochemii i Biofizyki PAN, ul. Pawińskiego 5a, 02-106 Warszawa



KLASA	GEN	ROŚLINA	PATOGEN	GEN <i>Avr</i>	STRUKTURA*
I	<i>RPS2</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>	<i>avrRpt2</i>	
Podklasa I	<i>RPM1</i>	<i>A. thaliana</i>	<i>P. syringae</i> pv. <i>maculicola</i>	<i>avrRpm1</i>	
	<i>Prf</i>	<i>Lycopersicon esculentum</i>	<i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i>	<i>avrPto</i>	
	<i>I2C-1</i>	<i>L. esculentum</i>	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	nieznany	
Podklasa II	<i>N</i>	<i>Nicotiana tabacum</i>	TMV	replikazy TMV?	
	<i>L<sup>6</sup></i>	<i>Linum usitatissimum</i>	<i>Melampsora lini</i>	AL <sup>6</sup>	
	<i>M</i>	<i>L. usitatissimum</i>	<i>M. lini</i>	AM	
	<i>Rpp5</i>	<i>A. thaliana</i>	<i>Peronospora parasitica</i> Noco2	<i>avrPp5</i>	
II	<i>Cf-2</i>	<i>L. esculentum</i>	<i>Cladosporium fulvum</i>	<i>Avr2</i>	
	<i>Cf-4</i>	<i>L. esculentum</i>	<i>C. fulvum</i>	<i>Avr4</i>	
	<i>Cf-5</i>	<i>L. esculentum</i>	<i>C. fulvum</i>	<i>Avr5</i>	
	<i>Cf-9</i>	<i>L. esculentum</i>	<i>C. fulvum</i>	<i>Avr9</i>	
	<i>Hs1<sup>pro-1</sup></i>	<i>Beta vulgaris</i>	<i>Heterodera schachtii</i> Schmidt	nieznany	
III	<i>Pto</i>	<i>L. esculentum</i>	<i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i>	<i>avrPto</i>	
IV	<i>Xa21</i>	<i>Oryza sativa</i>	<i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i>	nieznany	

BK-błona komórkowa  
\*termin struktura odnosi się do występowania w produkcie białkowym domen, o których obecności wnioskuje się na podstawie analizy sekwencji. Oznaczenia dla poszczególnych domen:

- suwak leucynowy
- region podobieństwa do białek Toll i receptora dla interleukiny 1
- domena wiążąca nukleotydy
- domena o aktywności kinazy serynowo-treoninowej
- powtórzenie bogate w leucynę o charakterze wewnątrzkomórkowym
- powtórzenie bogate w leucynę, o charakterze zewnątrzkomórkowym
- domena o charakterze transbłonowym

Ryc. 1. Zestawienie wyizolowanych roślinnych genów odporności.

konstruowania mieszańców międzygatunkowych między zbożami i spokrewnionymi gatunkami roślin występującymi w stanie dzikim. Jednak dopiero w latach dziewięćdziesiątych udało się wyodrębnić pierwsze geny warunkujące odporność roślin (geny *R*). Do tej pory poznano sekwencję kilkunastu z nich, wyizolowanych z różnych roślin i determinujących odporność na chorobotwórcze wirusy, bakterie, grzyby czy nicienie. Interesującym jest, że choć sklonowane geny pochodzą z niespokrewnionych gatunków roślin i warunkują odporność na choroby o różnej etiologii, kodują one białka wykazujące charakterystyczne cechy budowy.

Wykorzystując podobieństwa w strukturze i lokalizacji produktów genów *R* podzielono je na cztery klasy (Ryc. 1). Pierwsza z nich obejmuje geny kodujące białka zawierające konserwowaną ewolucyjnie sekwencję wiążącą nukleotydy (NBS ang. *nucleotide binding sequence*) oraz liczne powtórzenia bogate w leucynę (LRR ang. *leucine reach repeat*). W tej klasie można wydzielić dalej dwie podklasy. W pierwszej z nich, oprócz wymienionych elementów produkty posiadają na N-końcu białka sekwencję typową dla suwaka leucynowego. Do grupy tej należą geny: *RPS2*, *RPM1* [1-3] z *Arabidopsis thaliana* (oba kodują odporność na *Pseudomonas syringae*, odpowiednio pv. *tomato* i pv. *maculicola*), *Prf* [4] z pomidora (odporność na *P. syringae* pv. *tomato*) oraz *I2C-1* [5] także z pomidora (odporność na *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*). Produkty drugiej podklasy posiadają N-końcową domenę homologiczną do cytoplazmatycznej części białka Toll, związanego z programem rozwojowym i reakcją obronną *Drosophila melanogaster* oraz do receptora dla interleukiny 1 systemu immunologicznego ssaków (tzw. domena TIR). W skład podklasy tej wchodzi: gen *N* [6] z tytoniu (odporność na wirusa mozaiki tytoniowej TMV), *L<sup>6</sup>* i *M* [7, 8] z lnu (odporność na różne rasy grzyba *Melampsora lini*) oraz

*Rpp5* [9] z *A. thaliana* (odporność na *Peronospora parasitica*, Noco2). Drugą klasę tworzą geny: *Cf-2* [10], *Cf-4*, *Cf-5* [11] i *Cf-9* [12] z pomidora (odporność na różne rasy *Cladosporium fulvum*) oraz *Hs1<sup>pro-1</sup>* [13] z buraka cukrowego (odporność na *Heterodera schachtii* Schmidt) kodujące białka przypominające budową receptory komórek zwierzęcych. Niemal w całości zbudowane są one z jednostek LRR położonych zewnątrzkomórkowo, z hipotetycznej domeny transbłonowej oraz niewielkiej domeny cytoplazmatycznej zlokalizowanej na C-końcu białka. Do trzeciej klasy zalicza się gen *Pto* z pomidora [14] determinujący odporność na *P. syringae* pv. *tomato*. Produkt białkowy *Pto* wykazuje aktywność kinazy serynowo-treoninowej. Jak wynika z badań genetycznych, dla wystąpienia cechy odporności oprócz *Pto* niezbędna też jest obecność innego, wspomnianego powyżej, genu *Prf*. Czwartą klasę stanowi, jak na razie, jeden gen *Xa21* wyizolowany z ryżu, który nadaje odporność na *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* [15]. Koduje on białko o budowie zbliżonej do receptorów błonowych komórek zwierzęcych o aktywności kinazy. Receptory te zbudowane są z zewnątrzkomórkowej domeny wiążącej ligand, połączonej z cytoplazmatyczną domeną wykazującą aktywność kinazy. Aktywacja ich następuje poprzez przyłączenie ligandu do domeny zewnątrzkomórkowej, co pociąga za sobą zmianę konformacji białka a tym samym zwiększenie aktywności katalitycznej domeny cytoplazmatycznej. Produkt genu *Xa21* posiada N-końcową domenę LRR eksponowaną na zewnątrz komórki, domenę transbłonową oraz cytoplazmatyczną domenę o charakterze kinazy serynowo-treoninowej. Tak więc, białko to łączy cechy białek z klasy II i III.

W podanej klasyfikacji nie uwzględniono pierwszego wyizolowanego roślinnego genu odporności *Hm1* z kukurydzy. Warunkuje on odporność na grzy-

ba *Cochliobolus carbonum*, wytwarzającego toksynę Hc. Mutacje znoszące produkcję toksyny są recesywne i korelują z utratą zjadliwości patogena. Toksyna Hc hamuje *in vitro* aktywność deacetylazy histonowej z kukurydzy [16]. Stąd postuluje się, że mechanizm działania toksyny Hc *in vivo* polega na inhibicji deacetylazy histonowej. Zgodnie z tą hipotezą, traktowanie embrionów oraz zawiesiny komórkowej, z wrażliwej linii kukurydzy, toksyną Hc prowadzi do nagromadzenia hiperacetylowanych form histonów H3 i H4. Podobnie, w odpowiedzi na toksynę lub infekcję szczepem *C. carbonum*, produkującym tę toksynę, wrażliwe linie kukurydzy akumulowały hiperacetylowane formy histonów H3 i H4 [17]. Gen *Hm1* z kukurydzy koduje zależną od NADPH reduktazę inaktywującą grzybową toksynę [18]. W tym przypadku odporność rośliny opiera się nie na rozpoznaniu patogena, lecz na inaktywacji jednego z czynników odpowiedzialnych za jego zjadliwość. Nic więc dziwnego, że gen ten nie wykazuje jakichkolwiek podobieństw do opisanych powyżej genów.

## II.1. Funkcje przypisywane poszczególnym domonom białek kodowanych przez roślinne geny odporności

### II-1.1. Powtórzenia bogate w leucynę

Najbardziej znaną cechą nieomal wszystkich opisanych powyżej białek R jest obecność powtórzeń bogatych w leucynę. Motywy LRR to seria powtórzonych ok. 24 aminokwasów. Zawierają one na ogół leucynę bądź inny hydrofobowy aminokwas w regularnych odstępach. Motywy LRR występują nie tylko w produktach genów *R* ale także w wielu poznanych dotąd białkach i biorą udział w oddziaływaniach białko-białko, białko-węglowodany oraz w wiązaniu peptydowych ligandów [19].

Rośliny transgeniczne ryżu wyrażające jedynie domenę LRR białka Xa21, nabyły częściową odporność na sześć szczepów *X. oryzae* [20], co sugeruje, że domena ta bierze udział w rozpoznawaniu czynnika chorobotwórczego. Także wyniki analizy hybrydowych alleli genu *L* z *lnu*, kodujących różne kombinacje domen oraz naturalnych wewnątrzgenowych rekombinantów silnie przemawiają za tym, że domeny LRR determinują w głównej mierze specyficzność reakcji rozpoznania patogena [21]. Z kolei, delecje w obrębie domeny LRR białka M z *lnu* prowadzą do utraty odporności [8]. Różnice między czterema sklonowanymi genami *Cf* (*Cf-2*, *Cf-4*, *Cf-5* i *Cf-9*) z pomidora dotyczą głównie części kodującej domenę LRR, co wskazuje, że również w przypadku tych genów domena LRR może odpowiadać za specyfikę oddziaływań z różnymi szczepami patogena.

Pojedyncze podstawienia aminokwasowe w domenie LRR białek Rps2, Rpm1 i N prowadzą do zaniku reakcji nadwrażliwości (HR) [20]. Dowodzi to, że

nawet niewielkie zmiany w obrębie LRR powodują zaburzenia w odpowiedzi obronnej rośliny. Jakkolwiek powszechnie przyjmuje się, że domena LRR związana jest z rozpoznaniem czynnika chorobotwórczego, nie można wykluczyć, że domena ta umożliwia interakcję białka R z kolejnymi białkowymi składnikami w kaskadzie przekazywania sygnału. Ten ostatni mechanizm znany jest u *Saccharomyces cerevisiae*, kiedy na skutek aktywacji receptora dochodzi do oddziaływania białka Ras z domeną LRR cykazy adenylowej. Motywy LRR w białkach R pierwszej klasy (to jest w białkach R zawierających sekwencję wiążącą nukleotydy), posiadają niedokładne powtórzenia o sekwencji podobnej do sekwencji LRR występującej w drożdżowej cykazy adenylowej, podczas gdy motywy LRR pozostałych białek (klasa druga i czwarta) ściśle przystają do konsensusu i zawierają konserwowaną glicynę charakterystyczną dla położonych zewnątrzkomórkowo domen z powtórzeniami leucynowymi. Stąd wydaje się prawdopodobne, że domena ta mogłaby pełnić odmienne funkcje w różnych typach białek R.

### II-1.2. Sekwencja wiążąca nukleotydy

Miejsce wiązania nukleotydów (NBS) stanowi element wielu białek (białek Ras, ATP-azy, czynników elongacyjnych translacji i białek G) krytycznych dla fundamentalnych procesów komórkowych. Fakt, że również szereg białek R zawiera trzy konserwowane motywy charakterystyczne dla NBS sugeruje, że wiązanie trójfosforanów nukleotydów (ATP, GTP) ma znaczenie dla prawidłowego funkcjonowania tych białek. Opierając się na zmianach fenotypowych różnych mutacji ras, poddano ukierunkowanej mutagenie sekwencję NBS genu *N* [21], a następnie tak zmodyfikowane geny wprowadzono do tytoniu. W roślinach wrażliwych na infekcję TMV były one niesfunkcjonalne. Natomiast w roślinach posiadających funkcjonalny gen *N*, mutacje te miały charakter dominujący i negatywny. Niektóre z nich prowadziły do obniżenia odporności bądź całkowitej jej utraty. Sugeruje to, że białko N działa jako dimer lub też jego forma zmutowana inaktywuje białka pomocnicze uczestniczące w procesie rozpoznawania wirusa. Podobnie mutacje dotyczące aminokwasów krytycznych dla wiązania nukleotydów, wprowadzone do białka Rps2, powodują brak odpowiedzi typu HR [20]. Domena ta jest więc niezbędna dla prawidłowego funkcjonowania białka. Na podstawie dotychczasowych danych nie można jednak stwierdzić, czy dochodzi do przyłączenia nukleotydu i jego uwolnienia z rozszczepieniem wysokoenergetycznego wiązania.

### II-1.3. Suwak leucynowy

Jedynie hipotetyczne rozważania można prowadzić nad znaczeniem sekwencji kodującej domenę białka

o strukturze suwaka leucynowego, która znajduje się na 3' końcu niektórych genów klasy I. Struktura ta umożliwia oddziaływania między białkami poprzez wytworzenie konformacji zwiniętego kłęбка (ang. *coiled-coil*). Bierze ona udział w tworzeniu homo- i heterodimerów eukariotycznych czynników transkrypcyjnych. Jej obecność stwierdzono także w wielu białkach o różnych funkcjach takich jak: miozyna czy podjednostki białek G [22, 23]. W chwili obecnej sprawdza się możliwość homodimeryzacji produktów genów *R* a także stosując drożdżowy system dwuhybrydowy poszukuje się innych białek, które mogłyby oddziaływać z nimi poprzez domenę suwaka leucynowego.

#### II-1.4. Regiony wykazujące podobieństwo do białek Toll i receptora interleukiny 1

W produktach genów *R* jednej z podgrup klasy I występuje duża domena, zwana TIR, wykazująca podobieństwo do cytoplazmatycznej sygnałnej części receptora dla interleukiny 1 (I1-1R) ssaków oraz receptora Toll *Drosophila*. Co ciekawe, aktywacja receptorów Toll oraz I1-1R prowadzi do uruchomienia odpowiedzi obronnej skierowanej przeciw drobnoustrojom. Mutacje w obrębie domeny TIR prowadzą do upośledzenia bądź zaniku funkcji produktów genów *L* i *N* [21] wskazując, że domena ta jest niezbędna dla rozpoznania patogena przez roślinę.

#### II-1.5. Domena o aktywności kinazy serynowo-treoninowej

Obecność domeny kinazy serynowo-treoninowej w białku Pto oraz Xa21 sugeruje ważką rolę procesu fosforylacji w przekazywaniu sygnału o infekcji. Produkt genu *Pto* wykazuje aktywność kinazy białkowej *in vitro* [24]. Doświadczenia z użyciem drożdżowego systemu dwuhybrydowego sugerują, że produkt genu *Pto* bezpośrednio oddziałuje z czynnikiem AvrPto [25, 26]. Konstrukcja i analiza hybrydowych genów *Pto* wskazuje, że jedna z domen (domena VIII), nadająca białku specyficzność kinazy serynowo-treoninowej, jest niezbędna dla interakcji białka Pto z bakteryjnym czynnikiem AvrPto. Ten sam region jest również konieczny dla wywołania odpowiedzi typu HR w transgenicznym pomidorach po ich infekcji przez bakterię *P. syringae* posiadającą gen *avrPto*. T a n g i w s p. [25] zaproponowali, że rolą czynnika AvrPto jest umożliwienie oddziaływania dwóch części białka Pto, co prowadzi do wzajemnej fosforylacji monomerów Pto. Hipoteza ta została potwierdzona przy użyciu drożdżowego systemu trójhybrydowego [21]. Ufosforylowane białko Pto, fosforyluje kolejną w kaskadzie kinazę serynowo-treoninową produkt genu *Pti1* [27]. Z białkiem Pto oddziałują również białka Pti4, Pti5 oraz Pti6; które, jak się przypuszcza, należą do rodziny czynników transkrypcyjnych (białka EREB), regulujących aktywność ge-

nów w odpowiedzi na zmiany stężenia etylenu. W modelu zaproponowanym ostatnio przez Martina [21], Pti1 reguluje odpowiedź HR, łącznie z Pti4, Pti5 oraz Pti6, które bezpośrednio uruchamiają ekspresję przynajmniej niektórych białek obronnych. Z badań genetycznych wynika, że w tym szlaku przekazywania sygnału bierze udział również produkt genu *Prf* [4]. Brak jednak ciągle odpowiedzi na pytanie, jaką pełni on rolę. Nasuwa się także pytanie, czy możliwa jest cytoplazmatyczna lokalizacja receptora o charakterze kinazy serynowo-treoninowej? W świetle ostatnich badań taka lokalizacja wydaje się wysoce prawdopodobna. Fakt, że kinaza białkowa Pto wymaga białka Prf, zawierającego motywy LRR, do nadania roślinie odporności, skłania do zaproponowania modelu dwuskładnikowego receptora. Receptor ten tworzyłaby kinaza serynowo-treoninowa (białko typu Pto) oraz białko zawierające domeny LRR (jeden z produktów genu odporności klasy I czy II). Układ taki nasuwa skojarzenia do białka Xa21 z ryżu.

#### II-2. Ewolucja genów *R*

Przetrwanie większości organizmów zależy od działania systemów zapewniających zmienność w obliczu nowych warunków środowiska. Podobnie, koniecznym jest, by rośliny atakowane przez szybko ewoluujące mikroorganizmy posiadały mechanizm nabywania nowych cech odporności, a tym samym dostosowywania się do innej sytuacji. Skuteczna obrona rośliny przeciw czynnikom chorobotwórczym zależy przede wszystkim od szybkiego rozpoznania obecności patogena. Zdolność rozpoznawania patogenów o danym genotypie jest dziedziczna, tak więc dla zachowania gatunku, równie istotnym jest, by w genomie rośliny znajdowało się wiele genów, które zapewniałyby odporność przeciw wielu różnorodnym patogenom.

Badania genetyczne pokazały, że organizacja roślinnych genów odporności w genomie może przybierać co najmniej cztery formy. Jedną z tych form jest obecność wielu alleli genu *R*, z których każdy warunkuje rozpoznanie innych ras bądź szczepów tego samego patogena. Przykładem jest locus *L* z lnu z 13-oma allelami warunkującymi odporność wobec różnych ras grzyba *M. lini*. W innym przypadku, pojedynczy gen *R* może występować jedynie w roślinie odpornej, jak *RPM1* z *A. thaliana*. Szereg ściśle sprzężonych genów może także budować złożone loci, jak ma to miejsce w locus *M* z lnu zawierającym ok. 15 spokrewnionych genów. Taki schemat budowy cechuje loci *N*, *Pto*, *Xa21* oraz wszystkie cztery geny *Cf*. Jeszcze inną konfigurację znaleziono w *A. thaliana*, gdzie w pewnych regionach genomu, np. na chromosomie 5, mapują się luźno ułożone geny zapewniające odporność na wirusy, grzyby i bakterie [28]. Jeden z nich: *MRC-J* determinuje odporność na wirusy, różne bakterie i jeden gatunek grzybów z klasy *Oomycetes* [21].

Opisano szereg mechanizmów pozwalających na

powstawanie niespotykanych dotąd cech odporności oraz na tworzenie nowych kombinacji cech rodzicielskich. Prawdopodobnie, najczęściej odbywa się to na drodze nierównocennego *crossing-over* poprzez sparowanie się różnych genów *R* w czasie mejozy. Do zmiany cech odporności dochodzi również na skutek konwersji genowej [29] oraz transpozycji [30]. Jak się wydaje, rośliny nie wytworzyły żadnego wyspecjalizowanego mechanizmu zapewniającego wysoką zmienność genów *R*. Badania genetyczne złożonego locus *Rp1* z kukurydzy warunkującego odporność na grzyb *Puccinia sorghi* ujawniły, że na drodze nierównocennego *crossing-over* oraz w mniejszym stopniu konwersji genowej dochodzi do częstej rekombinacji w tym regionie [29]. Prowadzi ona do powstania wariantów łączących cechy odporności obu rodziców oraz tworzenia roślin o zmienionym fenotypie. Wśród roślin potomnych zaobserwowano pojawianie się roślin niosących cechę odporności nie posiadaną przez żadnego z rodziców i warunkowaną przez nowy gen [29] oraz roślin wytwarzających nekrozy w nieobecności czynników chorobotwórczych [31]. Szczególnie korzystna, z punktu widzenia ewolucji, jest tandemowa organizacja genów. Organizacja taka zapewnia, z jednej strony kumulację cech odporności przeciw wielu patogenom, z drugiej zaś stanowi materiał genetyczny pozwalający na powstawanie genów kodujących białka o nowych, niespotykanych dotąd właściwościach. Jednak, również w przypadku loci utworzonych z pojedynczego genu zjawiska *crossing-over* oraz konwersji genowej odgrywać mogą ważką rolę.

Do modyfikacji genów *R* (zarówno w loci prostych, jak i złożonych) dochodzić może wskutek wielu innych wymienionych poniżej procesów. Jak opisano wcześniej, istnieje wiele przesłanek wskazujących, że domena LRR nadaje specyficzność białkom *R*. Zwielenokrotnienie bądź zmniejszenie liczby LRR może zmieniać właściwości percepcji patogena [32]. Wewnątrz domeny LRR białka *M* obecne są dwa powtarzające się motywy o długości ok. 150 aminokwasów i wysokim stopniu identyczności (75%). Co ciekawe, w trzech niezależnie wyizolowanych mutantach zaobserwowano identyczne rearanżacje, w których większa część pierwszego motywu oraz część drugiego ulegały wypadnięciu [8]. Wyniki te wskazują, że wewnątrzgenowa rekombinacja pomiędzy powtórzeniami albo zjawisko niewłaściwego sparowania podczas replikacji (ang. *slipped alignment*) mogą kreować nowe — strukturalnie zmienione geny. Porównanie sekwencji produktów czterech genów odporności pomidora — Cf-2, Cf-4, Cf-5 i Cf-9 na różne rasy *C. fulvum* wykazało, że różnice między nimi dotyczą głównie N-końcowej części domeny LRR. Region ten charakteryzuje się wysoką zmiennością, przypominającą, miejsce wiązania peptydu przez cząsteczkę MHC (układ zgodności tkanekowej), co wskazuje na istnienie mechanizmu pozytywnej selekcji zmian [21]. Poszczególne domeny tworzące białka drugiej podgrupy klasy I (białka typu N)

kodowane są przez odrębne egzony. Taka budowa genów sugeruje, że mechanizm tasowania egzonów (ang. *exon shuffling*) może również prowadzić do tworzenia genów warunkujących cechy o nowej specyficzności. Ponadto, introny transkryptów genów *L<sup>6</sup>* oraz *N* są wycinane na różne sposoby (ang. *alternative splicing*), w rezultacie mają powstawać białka nawet znacznie skrócone [6, 7]. W chwili obecnej trudno jest jednak rozstrzygnąć, czy białka te biorą udział w percepcji tego samego czynnika chorobotwórczego, co białko pełnej długości czy determinują specyficzność wobec innego szczepu bądź rasy patogena.

Analiza sekwencji siedmiu genów z wielogenowej rodziny *Xa21* z ryżu [30] pozwoliła na zaproponowanie modelu ewolucji tej rodziny. Proces ten zapoczątkowałyby duplikacja a następnie różnicowanie genów prowadzące do powstania dwóch odrębnych klas. W dalszych etapach na drodze nierównocennej rekombinacji pomiędzy elementami tej rodziny doszło do wzbogacenia rodziny o dodatkowe geny. Każdy ze scharakteryzowanych w tej grupie genów posiada wysoce konserwowany region położony tuż za kodonem inicjacji translacji. Rekombinacja w tej części genu mogła doprowadzić do wytworzenia nowych zestawów promotor/sekwencja kodująca. Kolejna duplikacja, tym razem dotycząca kilku genów rodziny *Xa21*, przyczyniłaby się ponownie do zwielenokrotnienia liczby genów. Stosunkowo niedawnym zdarzeniem ewolucyjnym byłoby wbudowanie elementów insercyjnych typu transpozonów. W locus *Xa21* odnaleziono ich 15 a ich integracja spowodowała prawdopodobnie powstanie genów kodujących białka o nowych właściwościach.

Model ten nasuwa pytanie skąd wyewoluowały geny odporności? Wydaje się, że ich najbardziej prawdopodobnymi przodkami mogły być geny kodujące białka biorące udział w systemach, percepcji i przekazywania sygnału, koniecznych dla normalnego wzrostu i rozwoju rośliny [28]. Znaczące podobieństwo białka *Xa21* do białek *A. thaliana* kodowanych przez geny *Clavata* i *Erecta* determinujące kształt i rozmiar organów kwiatowych wydaje się potwierdzać poprawność tego rozumowania. Produkty obu genów uczestniczą w przekazywaniu sygnału między komórkami z wykorzystaniem zewnątrzkomórkowego ligandu [33, 28, 34]. Podobny typ budowy prezentuje również białko stanowiące przypuszczalnie receptor dla brasy-nosterydów [35]. Z kolei, domena kinazy serynowo-treoninowej białka *Xa21* oraz *Pto* wykazuje podobieństwo do białka *SRK* [36] z *Brassica napus*, biorącego udział w reakcji odrzucenia własnego pyłku (ang. *self-incompatibility*).

### III. Zdarzenia zainicjowane rozpoznaniem obecności patogena

Zaproponowana przez Florę [37] hipoteza „gen-do-genu” zakłada, że do rozpoznania patogena i uru-

chomienia reakcji obronnej rośliny, dochodzi wyłącznie gdy patogen niosący gen *avr* atakuje roślinę zawierającą ściśle odpowiadający mu gen *R*. Zanim poznano budowę molekularną tych genów, przyjmowano na ogół, że produkt genu *R* stanowi rodzaj receptora, zaś gen *avr* (awirulencji) warunkuje powstawanie cząsteczki o charakterze ligandu. Produkt genu awirulencji sygnalizuje więc roślinie obecność patogena (termin awirulentny należy odróżnić od terminu niepatogenny, albowiem patogen posiadający gen *avr* jest patogenny wobec roślin nie posiadających odpowiedniego genu *R*).

Kiedy patogen niosący gen awirulencji *avr* atakuje komórki rośliny posiadającej specyficzny gen odporności *R*, dochodzi do rozpoznania go i uruchomienia złożonej strategii obronnej. Wczesne reakcje obejmują zmiany w przepuszczalności błony komórkowej prowadzące do wycieku jonów potasowych i chlorkowych na zewnątrz komórki oraz wnikania jonów wodorowych i wapniowych do wnętrza komórki. Następuje też wzmożona synteza nadtlenu wodoru zwana „wyrzutem wolnych rodników” (ang. *oxidative burst*) [11]. Produkowany tą drogą nadtlenek wodoru bierze udział w szeregu procesów reakcji obronnej, to jest: w bezpośrednim niszczeniu patogena, w „uszczelnieniu” ściany komórkowej poprzez jej lignifikację oraz poprzeczne usieciowanie białek w niej występujących oraz w uruchomieniu programowanej genetycznie śmierci komórki podczas reakcji nadwrażliwości (HR). Aktywowane są także te szlaki metaboliczne, które umożliwiają syntezę niskocząsteczkowych lipofilnych związków o właściwościach bakterio- i grzybobójczych, czyli fitoaleksyn. Percepcja patogena prowadzi bardzo często do uruchomienia reakcji nadwrażliwości, jednej z bardziej skutecznych strategii obronnych stosowanych przez roślinę. Polega ona na wytworzeniu nekroz w miejscu wniknięcia patogena, co zapobiega jego dalszemu rozprzestrzenianiu się. Nie wiadomo dotychczas co jest bezpośrednią przyczyną lokalizacji infekcji. Można przyjąć, że obumarła tkanka stanowi fizyczną barierę dla dalszej inwazji. Możliwe jednak, że reakcja ta ma pozbawić patogena składników odżywczych lub unicestwić go enzymami hydrolitycznymi uwalnianymi przez umierające komórki. Badania ostatnich lat wskazują, że śmierć komórki w reakcji nadwrażliwości jest genetycznie programowana i następuje w konsekwencji transkrypcji i translacji specyficznych genów gospodarza [38]. Choć istnieją pewne różnice morfologiczne proces ten przypomina apoptozę — jeden z typów programowanej śmierci komórek zwierzęcych. Reakcji nadwrażliwości towarzyszy synteza wielu specyficznych białek, które mogą brać udział w obronie rośliny przeciw drobnoustrojom, zwanych białkami PR [ang. *Pathogenesis Related*] [39].

Pierwotna infekcja może prowadzić do wytworzenia w całej roślinie długotrwałej podwyższonej odporności (SAR ang. *systemic acquired resistance*) na kolejne

infekcje spowodowane przez ten sam lub wiele innych często niespokrewnionych czynników chorobotwórczych, w tym wirusy, bakterie i grzyby. Mechanizm ten nie zapewnia jednak ochrony przeciw wszystkim patogenom. SAR może rozwinąć się zarówno u rośliny odpornej w następstwie odpowiedzi HR, jak również na skutek przebytej choroby u rośliny wrażliwej. Czas konieczny do powstania odporności typu SAR oraz okres, w którym się ona utrzymuje zależy od danego układu patogen-roślina. Niewiele wiadomo o kaskadzie zdarzeń prowadzącej do wytworzenia SAR. Można założyć, że zjawisko to obejmuje dwa etapy. W pierwszym dochodzi do rozpoznania patogena i wysłania sygnału o zakażeniu do innych, oddalonych części rośliny. W drugim, komórki docelowe odbierają sygnał i uruchamiają mechanizmy prowadzące do aktywacji genów SAR (wiele z nich należy do rodziny genów *PR*) i powstania zwiększonej odporności. Szereg danych eksperymentalnych wskazuje na ważką rolę kwasu salicylowego dla wytworzenia nabytej odporności [40]. Najbardziej przekonujących dowodów na krytyczne znaczenie kwasu salicylowego dla całego procesu patogenezy roślin przyniosły badania z wykorzystaniem transgenicznych roślin tytoniu zawierających bakteryjny gen *nahG* z *Pseudomonas putida* [41]. Produkt genu *nahG*, hydrolaza kwasu salicylowego, katalizuje reakcję przekształcenia kwasu salicylowego do katecholu. Tym samym, po zakażeniu rośliny z aktywnym genem *nahG* zdolne były do gromadzenia tylko niewielkich ilości kwasu salicylowego i w konsekwencji wykazywały ostrzejsze symptomy chorobowe, w porównaniu z roślinami kontrolnymi [41]. Rośliny te również nie były zdolne do wytworzenia odporności nabytej typu SAR. Powyższe dane potwierdzają udział kwasu salicylowego, zarówno w powstaniu odpowiedzi typu HR, jak i SAR. Jednak, wbrew pierwotnym przypuszczeniom, kwas salicylowy nie stanowi jedynej cząsteczki sygnałnej przemieszczającej się elementami sitowymi, by uruchomić odpowiedź w oddalonych częściach rośliny. Dla pełnego poznania natury SAR pomocna będzie charakterystyka mutantów upośledzonych w funkcjach SAR. Wyizolowano kilka klas takich mutantów *A. thaliana* z zaburzeniami na różnych etapach odpowiedzi. Fenotypy determinowane przez te mutacje obejmują zarówno rośliny o podwyższonej syntezie SA i ekspresji genów SAR oraz odporności, jak i niezdolne do syntezy SA i wytworzenia SAR. Ostatnio scharakteryzowano na poziomie molekularnym jedną z klas tych mutantów. Mutant *nim1*, choć gromadzi kwas salicylowy na skutek infekcji, nie jest zdolny do indukcji genów SAR. Sugeruje to, że mutacja blokuje szlak przekazywania sygnału poniżej kwasu salicylowego. Gen *NIMI* został sklonowany niezależnie przez dwie grupy [42, 43]. Okazało się, że produkt tego genu wykazuje znaczącą homologię do I $\kappa$ -B to jest inhibitora transkrypcji genów związanych z odpowiedzią immunologiczną ssaków (p. niżej).

#### IV. Reakcje obronne wspólne dla świata roślin i zwierząt

#### Podziękowania

Praca w części finansowana z grantu KBN# 6P20302006.

#### Piśmiennictwo

Produkty kilku z wyizolowanych genów *R* (druga podgrupa klasy I) posiadają na swym N-końcu domenę wykazującą homologię do cytoplazmatycznej części receptora dla interleukiny 1 (I1-1R) systemu immunologicznego ssaków i receptora Toll z *Drosophila melanogaster*, związanego z programem rozwojowym oraz odpornością wrodzoną. Oba receptory pośredniczą w aktywacji czynników transkrypcyjnych należących do rodziny Rel. Czynniki te, w normalnych warunkach wzrostu tworzą wieloskładnikowe heterokompleksy z białkami inhibującymi, zlokalizowane w cytoplazmie. Na skutek niekorzystnych dla komórki bodźców środowiskowych dochodzi do indukcji kaskady reakcji a jej skutkiem jest częściowa degradacja kompleksu białkowego prowadząca do uwolnienia i translokacji czynników transkrypcyjnych do jądra komórkowego. Tu aktywują geny związane z odpowiedzią obronną (w przypadku muszki owocowej ten sam receptor uruchamia również szlak przekazywania sygnału wiodący do ekspresji genów związanych z programem rozwojowym). W kaskadach tych biorą udział kinazy białkowe. Oba szlaki wykazują uderzające podobieństwa nie tylko funkcjonalne, lecz również strukturalne. Domena cytoplazmatyczna obu receptorów wykazuje znaczącą homologię. Podobieństwo cechuje także czynniki transkrypcyjne ssaczy: NF- $\kappa$ B oraz czynniki z *Drosophila*: dorsal (morfogen) i Dif (czynnik odporności pokrewny do Dorsal, ang. *dorsal-related immunity factor*), aktywowane odpowiednio przez związanie cytokiny do I1-1R oraz przez związanie przez receptor Toll ligandu *spätzle*. Podobne są również białka inhibujące — ssacze I- $\kappa$ B oraz cactus z *Drosophila*. W końcu podobieństwo sekwencji łączy kinazy — kinazę IRAK (związaną z receptorem dla interleukiny, ang. *IL-1R associated kinase*) oraz pelle. Co ciekawe, niektóre z białek uczestniczących w odpowiedzi obronnej roślin wykazują także strukturalne a przede wszystkim funkcjonalne pokrewieństwo nie tylko do białek receptorowych komórek zwierzęcych ale także do całej uruchomionej kaskady zdarzeń. I tak, domena kinazy serynowo-treoninowej białek Pto i Xa21 z białkami pelle i IRAK; NIM1 z białkami inhibującymi, grzybobójczy peptyd z rzodkiewki — defensyna (Rs-AFP1) z drosomycyną, peptydem także o właściwościach grzybobójczych aktywowanym przez kaskadę Toll u *D. melanogaster* [44, 45]. Z kolei wiadomo, że reaktywne formy tlenu oraz kwas salicylowy, których rola w procesie patogenezy roślin jest niepodważalna, mogą wpływać na aktywację transkrypcji zależną od czynnika NF- $\kappa$ B. Fakty te skłaniają nas ku interesującej hipotezie, że podobne szlaki przekazywania sygnału stanowią część reakcji obronnych wyższych eukariontów.

Artykuł otrzymano 30 kwietnia 1998 r.

Zaakceptowano do druku 1 października 1998 r.

1. Bent AF, Kunkel BN, Dahlbeck D, Brown KL, Schmidt R, Giraudat J, Leung J, Staskawicz BJ (1994) *Science* **265**: 1856-1860
2. Mindrinos M, Katagiri F, Yu G-L, Ausubel FM (1994) *Cell* **78**: 1089-1099
3. Grant MR, Godiard L, Straube E, Ashfield T, Lewald J, Sattler A, Innes RW, Dangl JL (1995) *Science* **269**: 843-846
4. Salmeron JM, Oldroyd GE, Rommens CM, Scofield SR, Kim HS, Lavelle DT, Dahlbeck D, Staskawicz BJ (1996) *Cell* **86**: 123-133
5. Ori N, Eshed Y, Paran I, Presting G, Aviv D, Tanksley S, Zamir D, Fluhr R (1997) *Plant Cell* **9**: 521-532
6. Whitham S, Dinesh-Kumar SP, Choi D, Hehl R, Corr C, Baker B (1994) *Cell* **78**: 1101-1115
7. Lawrence GJ, Finnegan EJ, Ayliffe MA, Ellis JG (1995) *Plant Cell* **7**: 1195-1206
8. Anderson PA, Lawrence GJ, Morrish BC, Ayliffe MA, Finnegan EJ, Ellis J (1997) *Plant Cell* **9**: 641-651
9. Parker JE, Coleman MJ, Szabo V, Frost LN, Schmidt R, Van Der Biezen E, Moores T, Dean C, Daniels MJ, Jones JD (1997) *Plant Cell* **9**: 879-894
10. Dixon MS, Jones DA, Keddie JS, Thomas CM, Harrison K, Jones JD (1996) *Cell* **84**: 451-459
11. Hammond-Kosack KE, Jones JD (1996) *Plant Cell* **8**: 1773-1791
12. Jones DA, Thomas CM, Hammond-Kosack KE, Balint-Kurti PJ, Jones JD (1994) *Science* **266**: 789-793
13. Cai D, Kleine M, Kifle S, Harloff HJ, Sandal NN, Marcker KA, Klein-Lankhorst RM, Salentijn EM, Lange W, Stiekema WJ, Wyss U, Grundler FM, Jung C (1997) *Science* **275**: 832-834
14. Martin GB, Brommonschenkel SH, Chunwongse J, Frary A, Ganai MW, Spivey R, Wu T, Earle ED, Tanksley SD (1993) *Science* **262**: 1432-1436
15. Song W-Y, Wang G-L, Chen L-L, Kim H-S, Pi L-Y, Holsten T, Gardner J, Wang B, Zhai W-X, Zhu L-H, Fauquet C, Ronald P (1995) *Science* **270**: 1804-1806
16. Brosch G, Ransom R, Lechner T, Walton JD, Loidl P (1995) *Plant Cell* **7**: 1941-1950
17. Ransom RF, Walton JD (1997) *Plant Physiol* **115**: 1021-1027
18. Johal GS, Briggs SP (1992) *Science* **258**: 985-987
19. Kobe B, Deisenhofer J (1995) *Curr Opin Struct Biol* **5**: 409-416
20. Baker B, Zambryski P, Staskawicz B, Dinesh-Kumar SP (1997) *Science* **276**: 726-733
21. Dangl J, Holub E (1997) *Cell* **91**: 17-24
22. Lupas A, Van Dyke M, Stock J (1991) *Science* **252**: 1162-1164
23. Hamm HE, Gilchrist A (1996) *Curr Opin Cell Biol* **8**: 189-196
24. Loh Y-T, Martin GB (1995) *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 4181-4184
25. Tang X, Frederick RD, Zhou J, Halterman DA, Jia Y, Martin GB (1996) *Science* **274**: 2060-2062
26. Scofield SR, Tobias CM, Rathjen JP, Chang JH, Lavelle DT, Michelmore RW, Staskawicz BJ (1996) *Science* **274**: 2063-2065
27. Zhou J, Loh Y-T, Bressan RA, Martin GB (1995) *Cell* **83**: 925-935
28. Hammond-Kosack KE, Jones JD (1997) *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **48**: 575-607
29. Richter TE, Pryor TJ, Bennetzen JL, Hulbert SH (1995) *Genetics* **141**: 373-381
30. Song W-Y, Pi L-Y, Wang G-L, Gardner J, Holsten T, Ronald PC (1997) *Plant Cell* **9**: 1279-1287

31. Hu G, Richter TE, Hulbert SH i Pryor T (1996) *Plant Cell* **8**: 1367-1376
32. Staskawicz BJ, Ausubel FM, Baker BJ, Ellis JG, Jones JD (1995) *Science* **268**: 661-667
33. Torii K U, Mitsukawa N, Oosumi T, Matsuura Y, Yokoyama R, Whittier RF, Komeda Y (1996) *Plant Cell* **8**: 735-746
34. Clark SE, Williams RW, Meyerowitz EM (1997) *Cell* **89**: 575-585
35. Li J, Chory J (1997) *Cell* **90**: 929-938
36. Nasrallah JB, Stein JC, Kandasamy MK, Nasrallah ME (1994) *Science* **266**: 1505-1508
37. Flor HH (1971) *Annu Rev Phytopatol* **9**: 275-296
38. Dangl JL, Dietrich RA, Richberg MH (1996) *Plant Cell* **8**: 1793-1807
39. Linthorst HJ (1991) *Crit Rev Plant Sci* **10**: 123-150
40. Klessig DF, Malamy J (1994) *Plant Mol Biol* **26**: 1439-1458
41. Gaffney T, Friedrich L, Vernooij B, Negrotto D, Nye G, Uknes S, Ward E, Kessmann H, Ryals J (1993) *Science* **261**: 754-756
42. Ryals J, Weymann K, Lawton K, Friedrich L, Ellis D, Steiner HY, Johnson J, Delaney TP, Jesse T, Vos P, Uknes S (1997) *Plant Cell* **9**: 425-439
43. Cao H, Glazebrook J, Clarke JD, Volko S, Dong X (1997) *Cell* **88**: 57-63
44. Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, Reichhart J-M, Hoffmann JA (1996) *Cell* **86**: 973-83
45. Terras FR, Eggermont K, Kovaleva V, Rikhel NV, Osborn RW, Kester A, Rees SB, Torrekens S, Leuven FV, Vanderleyden J, Cammue BP, Broekaert WF (1995) *Plant Cell* **7**: 573-588

## Cyjanogeneza u roślin

## Cyanogenesis in plants

IRENA SIEGIEŃ\*

*Spis treści:*

- I. Wstęp
- II. Biosynteza glikozydów cyjanogennych
- III. Katabolizm glikozydów cyjanogennych
  - III-1. Charakterystyka enzymów hydrolizujących
    - III-1.1.  $\beta$ -glikozydazy
    - III-1.2. Liazy  $\alpha$ -hydroksynitrylowe
- IV. Cyjanogeneza u gatunków polimorficznych
- V. Lokalizacja glikozydów cyjanogennych i enzymów hydrolizujących w roślinach cyjanogennych i ich znaczenie dla cyjanogenezy

*Contents:*

- I. Introduction
- II. Biosynthesis of cyanogenic glycosides
- III. Catabolism of cyanogenic glycosides
  - III-1. Characteristic of hydrolytic enzymes
    - III-1.1.  $\beta$ -glycosidases
    - III-1.2.  $\alpha$ -hydroxynitrile lyases
- IV. Cyanogenesis in polymorphic species
- V. Localisation of cyanogenic glycosides and their hydrolysing enzymes in cyanogenic plants and their significance for cyanogenesis

### I. Wstęp

W roku 1983 na łamach *Postępów Biochemii* ukazały się dwie obszerne prace przeglądowe podsumowujące stan wiedzy na temat struktury i występowania związków cyjanogennych [1], a także ich roli biologicznej w roślinach [2]. Zagadnienia związane z cyjanogenezą należą nadal do aktualnych problemów badawczych. Wiele roślin cyjanogennych jest wciąż wykorzystywanych jako pokarm dla zwierząt (np. koniczyna biała, len, sorgo), a w niektórych regionach świata również dla człowieka (np. dzika fasola, kasawa) [3]. Rośliny cyjanogenne mogą stanowić zagrożenie dla konsumentów ze względu na toksyczność HCN (cyjanowodoru), który jest uwalniany w wyniku hydrolizy

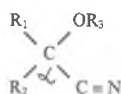
cyjanogenów. Możliwość zredukowania poziomu związków cyjanogennych w tych roślinach metodami inżynierii genetycznej spowodowała rozwój badań z zakresu biochemii, fizjologii i biologii molekularnej cyjanogenezy. Z drugiej strony wiadomo, że HCN pełni rolę regulacyjną w wielu procesach fizjologicznych (np. kiełkowanie nasion, redukcja azotanów) [4, 5]. Wyniki tych badań mogą dostarczyć dodatkowych argumentów, pozwalających uznać HCN za hormon roślinny [6]. W ostatnich latach, dzięki zastosowaniu najnowszych technik badawczych, nagromadziło się wiele nowych danych dotyczących zagadnień związanych z cyjanogenezą, które są przedmiotem niniejszego artykułu.

Cyjanogeneza, czyli zdolność uwalniania HCN z tkanek roślin, została stwierdzona dotychczas u ponad 2500 gatunków roślin wyższych należących do paprotników, roślin nagosiennych i okrytosiennych (jednoliściennych i dwuliściennych) [7]. Uwalnianie

\* Dr, Zakład Fizjologii Roślin, Instytut Biologii, Uniwersytet w Białymstoku, ul. Świerkowa 20B, 15-950 Białystok

**Tabela 1.**

Struktura niektórych glikozydów cyjanogennych (\*glu — glukoza; ksy — ksyloza; api — apioza)



R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	Glikozyd
-CH <sub>3</sub>	-CH <sub>3</sub>	β-D glukoza	linamaryna
-CH <sub>3</sub>	-CH <sub>3</sub>	gencjiozoza	linustatyna
	-H	β-D glukoza	proakacipetalina
	-H	β-D glukoza	diuryna
	-H	β-D glukoza	prunazyjna
	-H	gencjiozoza	amygdalina
	-H	wicjanoza	wicjanina
	-H	*glu-ksyl-api-kwas kawowy-glu	kserantyna

(\*glu- glukoza, ksy- ksyloza; api- apioza.)

cyjanowodoru w tkankach tych roślin jest najczęściej wynikiem hydrolizy glikozydów cyjanogennych, a w przypadku nasion niektórych roślin należących do *Sapindaceae* i *Hippocastanaceae* — cyjanogennych lipidów (7-8).

Cyjanogeneza nie występuje wyłącznie u roślin charakteryzujących się obecnością cyjanoglikozydów, czy cyjanolipidów. Wszystkie rośliny wyższe wytwarzają cyjanowodor jako produkt uboczny w procesie biosyntezy etylenu [9]. Ponadto HCN może powstawać z glioksalanu i hydroksyloaminy, produktów pośrednich odpowiednio fotooddychania i szlaku redukcji azotanów [2].

Wszystkie spośród wykrytych dotąd 75 glikozydów cyjanogennych — to O-β-glikozydy, pochodne α-hydroksynitryli. Zasadnicze różnice w budowie poszczególnych cyjanoglikozydów dotyczą budowy rodników R<sub>1</sub> i R<sub>2</sub>, a także reszty cukrowej związanej z grupą α-hydroksylową (R<sub>3</sub>) (Tab. 1).

W większości glikozydów cyjanogennych rodniki R<sub>1</sub> i R<sub>2</sub> są różne, co powoduje asymetrię atomu węgla α i możliwość występowania par związków epimerycznych. Stwierdzono występowanie szeregu takich epimerycznych par w naturze (np. (S) — diuryna i (R) — taksyfilina), ale zazwyczaj nie występują one w tej samej roślinie [10].

Wszystkie znane lipidy cyjanogenne są pochodnymi alifatycznych α-hydroksynitryli, a grupa α-hydroksylowa stabilizowana jest przez nasycone lub nienasycone reszty kwasów tłuszczowych [1].

Znaczenie fizjologiczne związków cyjanogennych w metabolizmie roślin nie jest ostatecznie wyjaśnione.

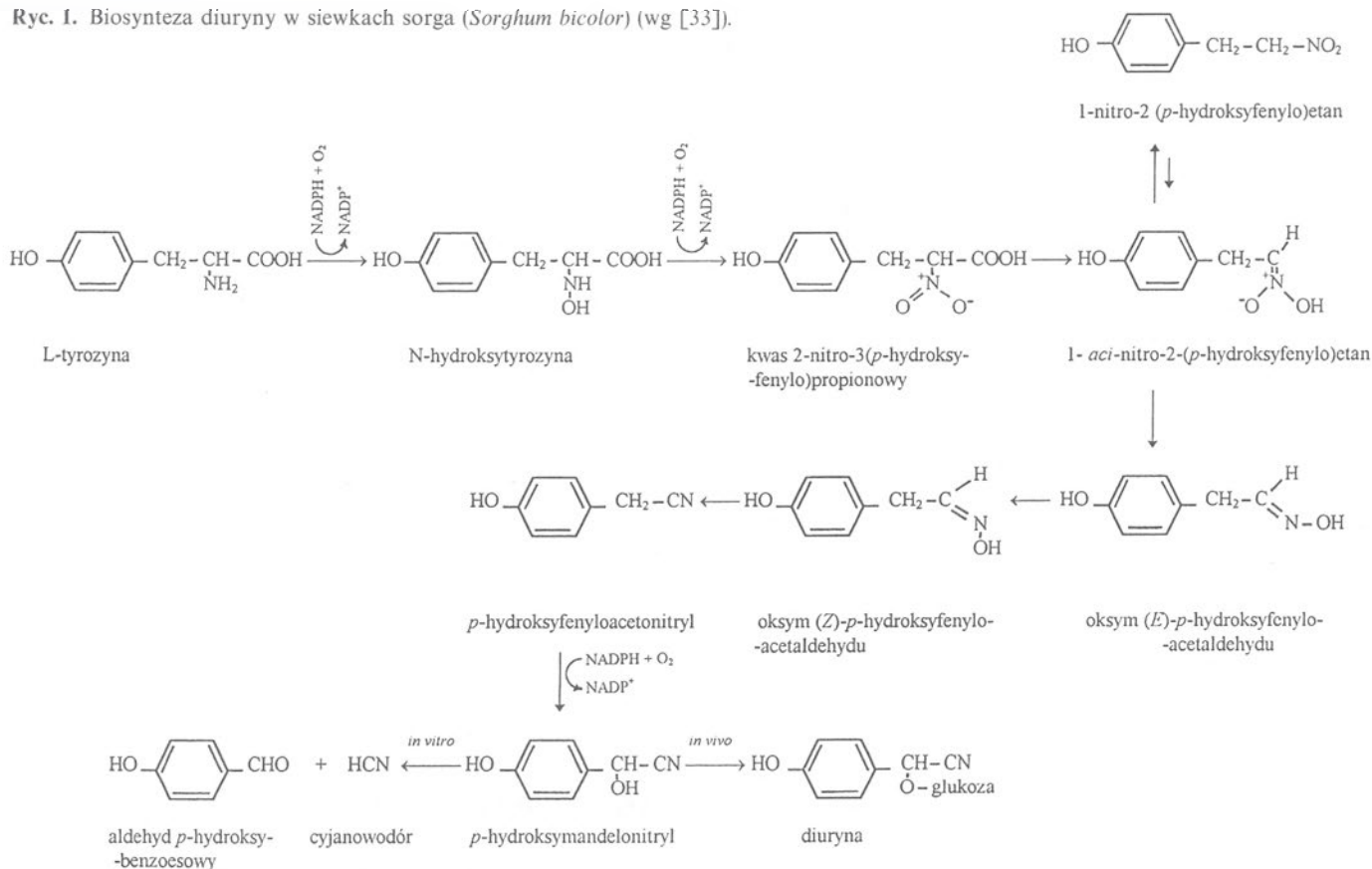
Wykazanie dobowych i sezonowych zmian ich poziomu w trakcie rozwoju roślin [np. 11-13] przemawiają przeciw hipotezie, że są one końcowymi (odpadowymi) produktami przemiany materii [14]. Koncepcja, że pełnią one rolę prekursorów białek (poprzez β-cyjanalaninę i asparaginę) jest ciągle przedmiotem sporów [15-17]. Natomiast dość dobrze udokumentowana jest rola związków cyjanogennych w ochronie przed roślinożercami (szczególnie owadami) i atakiem patogenów [18-19]. Wyniki niektórych badań, opracowane przy użyciu metod statystycznych wskazują, że występowanie cyjanogenów w roślinach warunkuje pewną specyficzność pokarmową roślinożerców (unikanie roślin cyjanogennych) [20]. Na uwagę zasługuje również pogląd, że ochronne właściwości cyjanoglikozydów nie są spowodowane jedynie przez HCN, który jest skutecznym inhibitorem oddychania i enzymów zawierających metale, ale także przez inne produkty ich rozpadu (aldehydy, ketony), które mogą posiadać właściwości cytotoksyczne [19]. Pewne dane jednakże wskazują, że HCN może szkodzić również roślinom cyjanogennym, osłabiając działanie innych mechanizmów obronnych [21].

## II. Biosynteza glikozydów cyjanogennych

Większość glikozydów cyjanogennych pochodzi od pięciu L-aminokwasów: tyrozyny, fenyloalaniny, waliny, leucyny i izoleucyny. W pierwszym etapie biosyntezy następuje N-hydroksylacja aminokwasu, przy udziale monooksygenazy wymagającej tlenu i NADPH. Powstały N-hydroksyaminokwas ulega oksydacyjnej dekarboksylacji do aldoksymu, z którego po dehydratacji powstaje nitryl. Stereospecyficzna hydroksylaza katalizuje następnie powstanie α-hydroksynitrylu, który w końcowym etapie biosyntezy ulega glikozylacji przez O-glikozylotransferazę do glikozydu cyjanogenego [22].

W badaniach prowadzonych w ostatnich latach nad biosyntezą diuryny w etiolowanych siewkach sorga (*Sorghum bicolor*) zidentyfikowano dodatkowe formy pośrednie na drodze aminokwas — α-hydroksynitryl: izomery (E)- i (Z)-oksymu *p*-hydroksyfenyloacetaldehydu, jak też 1-*aci*-nitro-2-(*p*-hydroksyfenylo)etanu [23-26], (Ryc. 1). W doświadczeniach *in vitro* [25], opartych na jednoczesnym pomiarze zużycia O<sub>2</sub> i utlenienia NADPH wykazano, że na drodze prowadzącej od tyrozyny do (S)-*p*-hydroksymandelonitrylu występują 3 etapy hydroksylacji, wymagające O<sub>2</sub>. Do przekształcenia tyrozyny w oksym *p*-hydroksyfenyloacetaldehydu niezbędne są dwie cząsteczki tlenu. Zużycie jednej cząsteczki O<sub>2</sub> na drodze między oksymem *p*-hydroksyfenyloacetaldehydu a *p*-hydroksybenzaldehydem wskazuje, że konwersja oksymu *p*-hydroksyfenyloacetaldehydu do *p*-hydroksyfenyloacetonitrylu zachodzi na drodze prostej dehydratacji. Fakt, że biosynteza diuryny w etiolownych siewkach sorga jest hamowana przez CO, a efekt ten jest odwracalny przez





promieniowanie o długości fali 450 nm, wskazuje na udział cytochromu P-450. Następnie zidentyfikowano dwie monooksygenazy, zależne od cytochromu P-450 i wymagające obecności NADPH i O<sub>2</sub>: N-hydroksylazę katalizującą przekształcenie tyrozyny do N-hydroksytyrozyny i C-hydroksylazę odpowiedzialną za stereospecyficzną konwersję p-hydroksyfeniloacetonitrylu do p-hydroksymandelonitrylu [25]. Również w biosyntezie innych cyjanoglikozydów wykazano udział cytochromu P-450 [27-28].

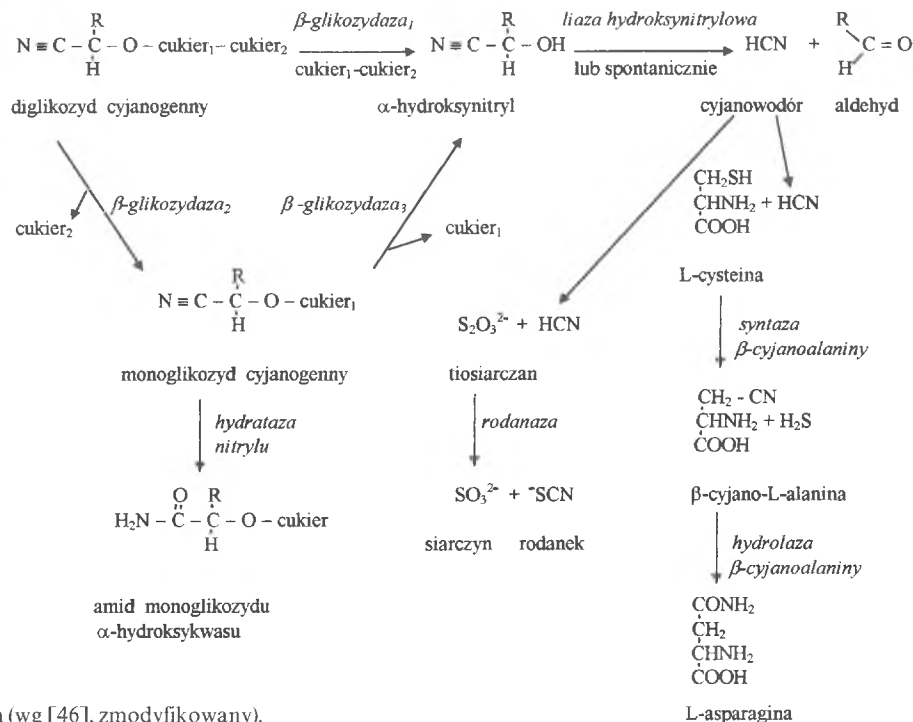
Enzymy, katalizujące poszczególne reakcje biosyntezy cyjanoglikozydów, poza ostatnim etapem, tworzą zwarty kompleks (kanał metaboliczny), związany z frakcjami mikrosomalnymi. Spośród tych enzymów wyizolowano jedynie niespecyficzną oksydoreduktazę zależną od NADPH i cytochromu P-450. Etapem ograniczającym syntezę aglikonu *in vitro* jest N-hydroksylacja aminokwasu [26, 30], a system enzymatyczny, katalizujący tę reakcję charakteryzuje się bardzo wysoką specyficznością substratową, w odróżnieniu od enzymów katalizujących następne etapy [27]. Preparaty mikrosomalne z lnu (*Linum usitatissimum*) [31] wykazują niską specyficzność substratową w stosunku do oksymów, a z kasawy (*Manihot esculenta*) — zarówno do oksymów jak i nitryli [27]. Preparaty mikrosomalne, zdolne do katalizowania biosyntezy aglikonu udaje się otrzymać wyłącznie z roślin etiolowanych [23, 27]. Aktywność biosyntetyczna preparatów z tkanek zielonych jest niewielka i nietrwała [32].

Pierwszymi zbadanymi enzymami, uczestniczącymi w biosyntezie związków cyjanogennych, były enzymy katalizujące ostatnią reakcję, tzn. glikozylację α-hyd-

roksynitrylu. Częściowo oczyszczono i scharakteryzowano β-glukozylotransferazy u kilku gatunków cyjanogennych: lnu (*Linum usitatissimum*), sorga (*Sorghum bicolor*), czereśni amerykańskiej (*Prunus serotina*) i świbki morskiej (*Triglochin maritima*) [33]. Większość z nich — to enzymy niestabilne, aktywne w pH 6.5-9.0, nie wymagające zwykle obecności jonów metali i kofaktorów. Enzymy te wykazują absolutną specyficzność w stosunku do UDPG (K<sub>m</sub> 0.029-1.0 mM), natomiast najlepszymi substratami są cyjanohydryny. Większość oczyszczonych glukozylotransferaz wykazuje wyraźną specyficzność w stosunku do różnych cyjanohydryn. Enzym lnu, gatunku zawierającego linamarynę i lotaustralinę, preferuje alifatyczne α-hydroksynitryle jako substraty, ale nie wykazuje stereospecyficzności. Natomiast u sorga, zawierającego tylko diurynę, UDPG-glukozylotransferaza wykazuje aktywność w stosunku do aromatycznych hydroksynitryli: p-hydroksy-(S)-mandelonitrylu i (S)-mandelonitrylu; ale nie glikozyluje odpowiednich (R) izomerów. Absolutną stereospecyficznością charakteryzują się także enzymy u *Prunus serotina* i *Triglochin maritima*, syntetyzujące odpowiednio (R)-prunazynę i (S)-taksyfilinę. Dotychczas nie badano pod tym względem enzymów, które katalizują glikozylację monoglikozydów cyjanogennych do odpowiednich di-, tri- i tetraglikozydów [33].

### III. Katabolizm glikozydów cyjanogennych

Uwalnianie HCN ze związków cyjanogennych jest procesem dwuetapowym, który zachodzi intensywnie



Ryc. 2. Katabolizm glikozydów cyjanogennych (wg [46], zmodyfikowany).

dopiero po mechanicznym uszkodzeniu tkanek rośliny cyjanogennej. Początkowo, w wyniku działalności jednej, lub kilku β-glikozydaz, zostaje odłączona reszta cukrowa. Następnie nietrwały α-hydroksynitryl (cyjanohydryna) dysocjuje spontanicznie, lub jest enzymatycznie rozkładany przy udziale liazy α-hydroksynitrylowej, na HCN i aldehyd lub keton [22] (Ryc. 2). Nieenzymatyczny rozkład cyjanohydryny zachodzi bardzo szybko jedynie w alkalicznym pH. Natomiast w zmacerowanej tkance, o kwaśnym pH, niezbędny jest udział liazy α-hydroksynitrylowej, która może 10-20 krotnie zwiększyć szybkość uwalniania HCN, w porównaniu do szybkości reakcji nieenzymatycznej w tych warunkach [34].

Warto zwrócić uwagę na fakt, że glikozy cyjanogenne mogą być również katabolizowane w roślinach nieuszkodzonych (niezmacerowanych), bez uwolnienia gazowego HCN. Dzieje się tak np. podczas kiełkowania nasion drzewa kauczukowego (*Hevea brasiliensis*) [35], kiedy powstały w wyniku hydrolizy cyjanoglikozydów HCN jest natychmiast włączany, przy udziale syntazy β-cyanoalaniny i hydrolazy β-cyanoalaniny do związków niecyjanogennych (Ryc. 2). HCN może być również metabolizowany przy udziale rodanazy, ale aktywność tego enzymu jest bardzo niska w roślinach wyższych [36]. Prawdopodobnie glikozydy cyjanogenne mogą być również metabolizowane w nieuszkodzonych roślinach wyższych, bez odłączenia reszty cukrowej. U kilku gatunków roślin należących do *Oliniaceae*, obok cyjanoglikozydu prunazy, stwierdzono obecność odpowiedniego amidu, który powstał w wyniku hydratacji grupy nitrylowej, przy udziale hydratazy nitrylu [37].

### III-I. Charakterystyka enzymów hydrolizujących

#### III-1.1. β-glikozydazy

Wszystkie β-glikozydazy uczestniczące w cyjanogenezie wykazują bardzo dużo podobieństw pod względem właściwości kinetycznych i molekularnych. Enzymy te charakteryzują się kwaśnym optimum pH (pH 4.0-6.2), i poza kilkoma wyjątkami, są glikoproteinami, o pI w zakresie pH 4.0-5.5. Pomimo znacznych różnic w natywnych masach molekularnych (40-600 kDa), większość z nich składa się z podjednostek o podobnej wielkości (55-65 kDa) [33]. β-glikozydazy, w przeciwieństwie do glikozylotransferaz, są wysoce stabilne, wiele z nich może być przechowywana, bez utraty aktywności w t. 4°C (w obecności azydku sodu) przez kilka miesięcy. Niektóre β-glikozydazy (linamarazy z kasawy i drzewa kauczukowego) mają szczególnie wysokie optima temperatury (55-62°C). Niezwykle wysoka stabilność i szczególne właściwości kinetyczne linamarazy z kasawy są wynikiem potranslacyjnych modyfikacji białka [38-39]. Jak dotychczas sklonowano linamarazę z młodych liści koniczyny białej (*Trifolium repens*) [40] i liścieni kasawy (*Manihot esculenta*) [39]. Oba enzymy wykazują duży stopień podobieństwa (43% identycznych sekwencji aminokwasowych), oba zawierają podobne miejsca glikozylacji i hydrofobowe, N-końcowe sekwencje sygnałne [39-40]. Właściwości te są odpowiedzialne za umiejscowienie enzymu w przestrzeni apoplastycznej [39-40].

β-glikozydazy hydrolizujące cyjanoglikozydy można sklasyfikować na podstawie ich specyficzności substratowej. Linamarazy z niektórych roślin charakteryzują się niską specyficznością substratową, są to raczej β-glikozydazy, niż linamarazy [41-42]. Nieco wyższą specyficzność substratową wykazuje linamara-

za (65 kDa) z kasawy, która hydrolizuje prunazynę i syntetyczne monoglikozydy ( $\beta$ -glukopyranozyd *p*-nitrofenolu), ale nie wykazuje aktywności w stosunku do diglikozydów cyjanogennych — amygdaliny, czy linustatyny [43]. Linustatynaza z nasion lnu wykazuje aktywność nie tylko w stosunku do natywnych  $\beta$ -diglikozydów — linustatyny i neolinustatyny, ale także diglikozydu amygdaliny; nie hydrolizuje jednak odpowiednich monoglikozydów. Uzyskana z tego samego materiału linamaraza hydrolizuje cyjanogenne  $\beta$ -monoglikozydy linamarynę i prunazynę, ale jest nieaktywna w stosunku do  $\beta$ -diglikozydów. Oba enzymy są aktywne w stosunku do niektórych syntetycznych monoglikozydów (np.  $\beta$ -D-glukopyranozyd *p*-nitrofenolu) [44]. Większość roślin cyjanogennych zawiera jednakże  $\beta$ -glikozydazy, charakteryzujące się wysoką specyficnością wobec natywnych glikozydów cyjanogennych. Są to  $\beta$ -glikozydazy wykazujące specyficzną w stosunku do taksyfiliny (świłka morska — *Triglochin maritima*), triglochiny (alokazja olbrzymia — *Alocasia macrorrhiza*, *Triglochin maritima*), wicianiny (wyka wąskolistna — *Vicia angustifolia*, *Davallia trichomanoides*), diuryny (sorgo — *Sorghum bicolor*), amygdaliny i prunazyny (czereśnia amerykańska — *Prunus serotina*) [22].

Hydroliza diglikozydów cyjanogennych może przebiegać w ten sposób, że dwie reszty cukrowe odłączane są kolejno, bądź też jednocześnie w postaci dwucukru (Ryc. 2). W pierwszym przypadku dwa etapy hydrolizy katalizowane są przez różne  $\beta$ -glikozydazy, czego przykładem jest hydroliza amygdaliny u *Prunus serotina*, linustatyny i neolinustatyny u *Linum usitatissimum* i *Manihot esculenta*. Natomiast hydroliza wicianiny u *Davallia trichomanoides* i *Vicia angustifolia* odbywa się na drodze jednoetapowej. Podczas kiełkowania nasion i wzrostu siewek *Hevea brasiliensis* hydroliza linustatyny, w zależności od potrzeb, może przebiegać jedno- lub dwuetapowo [45]. Znaczenie fizjologiczne tych zależności będzie rozważane w rozdz. V.

### III-1.2. Liazy $\alpha$ -hydroksynitrylowe

Liazy  $\alpha$ -hydroksynitrylowe, katalizujące dysocjacje  $\alpha$ -hydroksynitryli do HCN i aldehydu lub ketonu, oczyszczono i scharakteryzowano u roślin zawierających cyjanoglikozydy aromatyczne i alifatyczne. Enzymy te wykazują najwyższą, ale nie zawsze wyłączną, aktywność w stosunku do endogennych cyjanohydrin. Wszystkie znane liazy wykazują kwaśne optimum pH i punkt izoelektryczny między pH 3.9 a 4.8. Klasyfikuje się je ze względu na obecność FAD i reszty węglowodanowej, oraz ich stereospecyficzności [46].

Liazy (R)-(+)-mandelonitrylowe, zawierające FAD i reszty cukrowe, wyizolowano wyłącznie z gatunków należących do *Rosaceae* z podrodzin *Prunoideae* i *Malloideae*. Ich substratem jest (R)-(+)-mandelonitryl — produkt hydrolizy (R)-prunazyny lub amygdaliny [47]. Glikoproteiny te, o masie 50-80 kDa, stanowią do

10% rozpuszczalnych białek nasion, są serologicznie zbliżone do siebie i prawdopodobnie mogą pełnić również funkcję białek zapasowych [48]. U wielu gatunków występują różne izoformy liaz mandelonitrylowych, prawdopodobnie różniące się nieznacznie strukturą pierwszorzędową, lub miejscem przyłączenia reszty cukrowej, ale znaczenie fizjologiczne tej mikroheterogeniczności nie zostało jeszcze wyjaśnione. Enzymy te zawierają około 30% węglowodanów, połączonych wiązaniem N-glikozydowym z cząsteczką białka. Warunkiem aktywności enzymu jest obecność FAD w formie utlenionej, przyłączonego niekowalencyjnie w pobliżu miejsca katalitycznego, pomimo że liazy te nie katalizują typowych reakcji oksydo-redukcyjnych. Prawdopodobnie powstały one w toku ewolucji z flawinowych oksydoreduktaz [49], które utraciły zdolność katalizowania reakcji redox, a FAD pozostał składnikiem strukturalnym enzymu. Fakt, że liaza mandelonitrylowa z czereśni amerykańskiej (*Prunus serotina*) wykazuje znaczną homologię w stosunku do oksydoreduktaz zależnych od FAD potwierdza tę hipotezę [50]. Interesującym wydaje się fakt, że FAD-hydroksynitryliazę wyizolowano również z ciem (*Zygana trifolii*), żerujących na roślinach cyjanogennych [51].

Liazy  $\alpha$ -hydroksynitrylowe, nie zawierające FAD wyizolowano z tkanek wegetatywnych różnych roślin, należących zarówno do jedno- (np. sorgo), jak i dwuliściennych (np. len, kasawa) i stanowią one bardziej różnorodną grupę enzymów. Różnią się one między sobą masą cząsteczkową, zawartością węglowodanu, strukturą pierwszorzędową, a także sposobem połączenia podjednostek. Białka te mają zwykle wyższy ciężar cząsteczkowy niż liazy mandelonitrylowe, a niektóre z nich (z lnu, kasawy) wykazują skłonność do agregacji. Większość liaz należących do tej grupy, nie jest glikoproteinami ani nie jest spokrewniona z FAD-hydroksynitryliazami, ani na poziomie struktury aminokwasowej ani immunologicznie. Ponadto, większość z nich nie jest także serologicznie podobna między sobą [52-53]. Natomiast wykazano 75% homologii sekwencji cDNA, kodujących białko liaz  $\alpha$ -hydroksynitrylowych, pochodzących z *Hevea brasiliensis* [54], i *Manihot esculenta* [55], (roślin należących do *Euphorbiaceae*).

Interesującym enzymem jest liaza (S) mandelonitrylowa z liści *Ximenia americana* [56]. Podobnie jak liazy (R) mandelonitrylowe z gatunków należących do *Rosaceae* jest ona glikoproteiną, natomiast nie zawiera FAD i w odróżnieniu od liaz (R) mandelonitrylowych z *Rosaceae*, jest stereospecyficzna w stosunku do (S)-(-) mandelonitrylu.

## IV. Cyjanogeneza u gatunków polimorficznych

Spośród wielu gatunków roślin cyjanogennych wyróżnić można kilka, które są polimorficzne pod tym

względem, tzn. charakteryzujące się występowaniem osobników cyjanogennych i acyjanogennych: koniczyna biała (*Trifolium repens*), komonica zwyczajna (*Lotus corniculatus*), komonica wąskolistna (*Lotus tenuis*) i fasola limeńska (*Phaseolus lunatus*) [57]. U najlepiej poznanej koniczyny białej (*Trifolium repens*) polimorfizm cyjanogeny kontrolują allele dwóch niezależnie segregujących się loci: *Ac/ac* odpowiedzialnych za syntezę linamariny i lotaustraliny, i *Li/li* kontrolujących syntezę linamarazy — enzymu hydrolizującego te glukozydy. Fenotyp cyjanogeny wymaga obecności funkcjonalnych alleli obu loci. Wśród roślin acyjanogennych można wyróżnić 3 fenotypy charakteryzujące się: 1) — brakiem cyjanoglukozydów, 2) — brakiem  $\beta$ -glukozydazy (linamarazy), 3) — brakiem zarówno cyjanoglukozydów, jak i linamarazy [57]. Wykazano, że zarówno locus *Ac* jak i *Li* charakteryzują się niepełną dominacją, a zatem heterozygoty mają pośredni poziom linamarazy i cyjanoglukozydów [58-59]. Ekspresja genu *Ac* i *Li* zależy od różnych czynników środowiska, szczególnie od temperatury [10]. W roślinach *acac* brak jest co najmniej trzech enzymów, kierujących biosyntezą cyjanoglukozydów [60-61]. Wydaje się, że locus *Ac* składa się z kilku genów strukturalnych, odpowiedzialnych za biosyntezę cyjanoglukozydów, a allel *ac* jest mutacją przynajmniej trzech z nich. Mutacja *ac* może również dotyczyć sekwencji, regulującej ekspresją enzymów odpowiedzialnych za biosyntezę cyjanoglukozydów [57]. Więcej wiadomo na temat locus *Li*, kierującego biosyntezą linamarazy [62], którą wyodrębniono z młodych liści koniczyny białej (genotyp *LiLi acac*), wykrystalizowano i przeprowadzono wstępne analizy krystalograficzne [63]. Różnice biochemiczne między roślinami *LiLi* i *lili* wykorzystano do wyselekcjonowania klonów linamarazy z biblioteki cDNA pochodzącej z tych liści [64]. Klony te posłużyły następnie do scharakteryzowania alleli w locus *Li*. Wykazano metodą Northern blot, że najwięcej mRNA (który hybryduje z linamarazowym cDNA) syntetyzują rośliny homozygotyczne (*LiLi*), zaś heterozygoty (*Lili*) — na średnim poziomie. Natomiast niewielki poziom mRNA stwierdzano w niektórych organach roślin homozygotycznych (w liściach *lili* i korzeniach *LiLi*), w których nie obserwuje się aktywności enzymu. Może to być wynikiem komplementarności cDNA linamarazy z mRNA innych  $\beta$ -glukozydaz, niehydrolizujących cyjanogenów, bądź też faktem, że mRNA linamarazy jest produkowany w ilości oznaczalnej metodą Northern blot, ale stosowane metody nie wykrywają syntetyzowanego w niewielkich ilościach białka [57]. Pierwszą z tych możliwości zdają się potwierdzać wyniki analizy DNA metodą Southern blot, które wykazały, że w genomie koniczyny białej występują 3 geny komplementarne do cDNA linamarazy, a przynajmniej 2 z nich segregują się niezależnie. Zidentyfikowano i ustalono sekwencję nukleotydów jednego z genów  $\beta$ -glukozydazy hydrolizującej cyjanogeny (TRE104), na tej podstawie okreś-

lono sekwencję aminokwasową tego enzymu i porównano ją z innymi  $\beta$ -glukozydazami [40]. Enzym ten wykazuje wysokie podobieństwo do  $\beta$ -glukozydazy z tej samej rośliny, niezdolnej do hydrolizy linamariny (84% zgodności aminokwasowej), natomiast brak tej sekwencji homologicznych między nim a  $\beta$ -glukozydazą A z gorzkich migdałów (*Prunus amygdalus*), odpowiedzialną za hydrolizę diglukozydów cyjanogennych. Ponadto wykazano znaczną zgodność sekwencji aminokwasów (ponad 50%) między badaną  $\beta$ -glukozydazą z koniczyny białej a różnymi  $\beta$ -glukozydazami niektórych ssaków i bakterii [40]. O podobieństwach między linamarazą koniczyny białej (*Trifolium repens*) i kasawy (*Manihot esculenta*) [39] wspomniano już w rozdziale III-1.1.

## V. Lokalizacja glikozydów cyjanogennych i enzymów hydrolizujących w roślinach cyjanogennych

Zawartość glikozydów cyjanogennych w tkankach zmienia się wraz z wiekiem i etapem rozwoju rośliny cyjanogennej i jej organów [27, 65-67], jak również zależy od poziomu żywienia mineralnego i wielu innych czynników środowiskowych [68-69, 12].

Związkom cyjanogenym towarzyszą w większości tkanek enzymy, zdolne do ich rozkładu. Jednakże ich lokalizacja w roślinie cyjanogennej jest bardzo zróżnicowana. U koniczyny białej (*Trifolium repens*) zarówno substrat, jak i enzym znajdują się tylko w liściach [67], zaś u kasawy (*Manihot esculenta*) cyjanogenne są wszystkie wegetatywne części rośliny [70]. Cyjanogeneza u roślin nieuszkodzonych ograniczona jest jednak na skutek przestrzennego rozdzielania w komórce substratów i katabolizujących ich enzymów: cyjanoglikozydy gromadzone są w centralnej wakuoli komórek roślin cyjanogennych, zaś enzymy hydrolytyczne mogą występować w cytoplazmie lub przestrzeni apoplastycznej [45, 71]. Ponadto, jak wykazano dla *Sorghum bicolor*, rośliny w której badano jednocześnie lokalizację enzymów hydrolytycznych i ich substratów, cyjanoglukozyd diuryna występuje w wakuolach tkanki epidermalnej, natomiast diuryna zlokalizowana jest w plastydach i cytozolu komórek mezofilu [72].

Wiadomo, że biosynteza aglikonu ma miejsce w cytoplazmie i jest katalizowana przez enzymy związane z frakcjami mikrosomalnymi (rozdz. II). Ostatni etap, tj. glikozylacja niestabilnego hydroksynitrylu przy udziale UDPG-glikozylotransferazy, podobnie jak w przypadku biosyntezy flawonoidów, zachodzi prawdopodobnie w lumen retikulum endoplazmatycznego [73], a następnie cyjanoglukozydy są aktywnie transportowane do wakuoli [74]. Za asocjację glikozylotransferazy z błonami retikulum odpowiedzialna jest N-końcowa sekwencja sygnałowa [75]. Możliwe jest jednak, że podobnie jak w przypadku metabolizmu polifruktozydów, miejscem glikozylacji  $\alpha$ -hydroksyni-

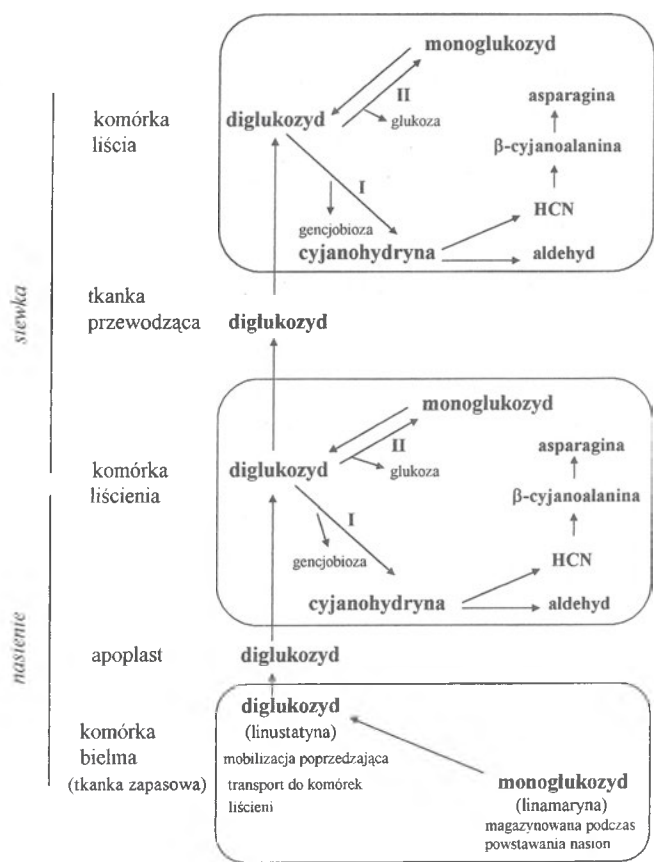
trylu jest wakuola [37].

$\beta$ -glukozydazy, hydrolizujące glukozydy cyjanogenne, ale nie wykazujące wyraźnej specyficzności (np. w liściach *Phaseolus lunatus* [76], *Hevea brasiliensis* [71], czy *Manihot esculenta* [77]), występują wyłącznie w przestrzeni apoplastycznej. U wielu innych roślin cyjanogennych aktywność tych enzymów przynajmniej częściowo związana jest z apoplastem [78-79]. Jedynie specyficzna  $\beta$ -glukozydaza (diurynaza) u *Sorghum bicolor* [72] i hydrolaza prunazyny w nasionach *Prunus serotina* [48], występuje wyłącznie w cytoplazmie. Podobnie, liazy hydroksynitrylowe odpowiedzialne za uwolnienie HCN, zlokalizowane są wewnątrz komórek roślin cyjanogennych [80-81].

Wykazano, że zarówno glikozydy cyjanogenne [35, 82], jak i cyjanolipidy [8] mogą być katabolizowane w nieuszkodzonych roślinach, bez uwolnienia gazowego HCN. Dzieje się tak np. podczas kiełkowania nasion i rozwoju siewek *Hevea brasiliensis*, kiedy to poziom cyjanoglikozydów w pojedynczej siewce obniża się o 85%, a powstający podczas tych procesów HCN nie uwalnia się, lecz jest wykorzystywany jako źródło azotu do syntezy aminokwasów, przez syntazę  $\beta$ -cyjanoalaniny i hydrolazę  $\beta$ -cyjanoalaniny [35]. Monoglukozyd linamaryna zgromadzony jest w bielmie nasion *Hevea*, natomiast wysoką aktywność syntazy  $\beta$ -cyjanoalaniny, wiążącej HCN stwierdzono w młodych siewkach. Po zapoczątkowaniu kiełkowania linamaryna musi być więc przetransportowana z bielma, poprzez liścienie, do młodych rosnących siewek i tam katabolizowana. Transport z bielma do liścieni odbywa się drogą apoplastyczną, a z liścieni do liści, poprzez system przewodzący. Ze względu na możliwość hydrolizy linamaryny przez występującą w apoplaście linamarazę [83], monoglukozyd ten ulega glukozytacji w bielmie do diglukozydu linustatyny — formy transportowej odpornej na działanie linamarazy [78]. Linustatyna, przetransportowana „bezpiecznie” przez apoplast z bielma do liścieni, a następnie do młodych liści (organów docelowych), jest tam degradowana przez „diglukozydazę równoczesną”, zaś uwalniany w wyniku hydrolizy cyjanohydryny HCN jest niezwłocznie włączany do związków niecyjanogennych (aminokwasów) [35]. Funkcjonowanie tego tak zwanego „szlaku linustatyny” (Ryc. 3), potwierdzają następujące obserwacje: a) linustatyna nie jest hydrolizowana przez linamarazę [41, 78]; b) poziom linustatyny w nasionach *Hevea* wzrasta podczas ich przechowywania [84]; c) linustatyna pojawia się w wydzielinie z bielma na tym etapie rozwoju, kiedy zawartość linamaryny się obniża, natomiast (d) w młodych tkankach siewek wzrasta poziom syntazy  $\beta$ -cyjanoalaniny i diglukozydazy, hydrolizującej linustatynę [35]; e) linustatynę znaleziono w wydzielinach liściowych i floemowych [85]; oraz (f) [ $^{14}\text{C}$ ] linamaryna, naniesiona na powierzchnię liścienia *Hevea*, pojawia się w tkankach tego organu w niewielkim stopniu, pozostała ilość jest prawdopodobnie metabolizowana

przez apoplastyczną linamarazę [83].

Do wyjaśnienia opisanych procesów przyczyniły się również wyniki badań, w których [ $^{14}\text{C}$ ] linustatynę наносono na jeden z liścieni *Hevea brasiliensis* [83]. Diglukozyd ten wchłaniał się bardzo wydajnie, co potwierdza, że jest on transportową formą cyjanogenu, niewrażliwą na działanie apoplastycznej linamarazy. Początkowo większość radioaktywności w tkankach liścienia stanowiła [ $^{14}\text{C}$ ] linustatyna, kilka godzin później, znaczną jej część odnajdywano w [ $^{14}\text{C}$ ] linamarynie (monoglukozydzie czasowo akumulowanym w liścieniach) i nieco mniejszą — w związkach niecyjanogennych. Podczas dalszej inkubacji, na skutek ubytku linamaryny, poziom radioaktywności w liścieniu obniżał się, a [ $^{14}\text{C}$ ] linamaryna, niewielkie ilości [ $^{14}\text{C}$ ] linustatyny i znakowanych związków niecyjanogennych pojawiały w pozostałych częściach młodej siewki (liście, pęd, korzenie). Wyniki tych badań wskazują, że linustatyna nie musi być metabolizowana w tkankach *Hevea* wyłącznie do związków niecyjanogennych. Znaczna część tego diglukozydu może ulec przekształceniu (ponownemu) do monoglukozydu — linamaryny. A zatem, w siewkach *Hevea* poza tzw. „diglukozydazą równoczesną” odpowiedzialną za odłączenie gencjiobiozy, musi być aktywna „diglukozydaza etapowa”, zdolna do odłączenia od linustatyny tylko końcowej cząsteczki glukozy [83]. Na skutek



(I - „diglukozydaza równoczesna”, II - diglukozydaza etapowa”)

Ryc. 3. Przemiany metaboliczne mono- i diglukozydów cyjanogennych podczas kiełkowania nasion i wzrostu siewek *Hevea* (wg [83], zmodyfikowany).

różnych aktywności obu diglukozydaz, w zależności od zapotrzebowania rośliny, linustatyna może pełnić zasadniczą rolę w metabolizmie linamaryny do związków niecyjanogennych, lub uczestniczyć w „zwykłym” transporcie tego monoglukozydu do tkanki docelowej. W tkankach niektórych odmian roślin *Hevea brasiliensis* i innych gatunków *Hevea* procesy te zachodzą równocześnie, prawdopodobnie z różną intensywnością [45, 84]. Całokształt opisanych przemian, zachodzących podczas kiełkowania nasion i wzrostu siewek *Hevea* przedstawiono na rycinie 3.

Należałoby się zastanowić, czy opisany dla *Hevea* sposób transportu i metabolizowania linamaryny, funkcjonuje w przypadku innych roślin cyjanogennych i innych cyjanoglikozydów. Obecność linustatyny stwierdzono w tkankach wielu dotychczas badanych roślin cyjanogennych, zawierających linamarynę, np. *Manihot esculenta*, *Linum usitatissimum*, *Trifolium repens*, czy *Phaseolus lunatus*; a w przestrzeni apoplastycznej tych roślin stwierdzono aktywność linamarazy [45]. Możliwe jest zatem, że występujący diglikozyd jest transportową formą cyjanogenu, co wykazano już dla *Manihot esculenta* [86]. Również w tkankach siewek *Sorghum bicolor* poza diuryną, stwierdzono niewielką ilość diglikozydu (6'-glukozyd diuryny). Obecność tego związku w znacznych ilościach w kroplach gutacyjnych (wydzielina z apoplastu), może również potwierdzać hipotezę o diglikozydach jako formie transportowej monoglikozydów [87]. Zależności te mogą być prawdziwe nie tylko na etapie kiełkowania, ale także dojrzewania nasion niektórych roślin cyjanogennych [88, 45], jak również w przypadku transportu cyjanogenów z jednych organów do drugich (np. ze starszych liści do młodszych) [83, 86, 89]. Translokacja cyjanogenu w postaci diglikozydu wydaje się być niezbędna nie tylko w przypadku transportu przez apoplast, ale także w przypadku transportu symplastycznego [71].

Pomimo tego, że minęło prawie 200 lat od odkrycia cyjanogenezy [90], metabolizm i znaczenie fizjologiczne związków cyjanogennych nie zostały do końca wyjaśnione. Możliwości badawcze, jakich dostarcza inżynieria genetyczna, a także rozwój innych technik badawczych, stosowanych w biologii molekularnej, biochemii i fizjologii roślin, zapewne przyczynią się w najbliższych latach do wyjaśnienia wielu zagadnień, związanych z cyjanogenezą, a także wykrycia kolejnych cyjanogenów.

#### Podziękowania

Panu Prof. dr hab. Stanisławowi Lewakowi z Instytutu Biologii Eksperymentalnej Roślin UW serdecznie dziękuję za wiele cennych uwag dotyczących niniejszej pracy.

Artykuł otrzymano 26 marca 1998 r.

Zaakceptowano do druku 28 września 1998 r.

#### Piśmiennictwo

1. Dziewanowska K (1983) *Post. Biochem.* 29: 191-225

2. Dziewanowska K (1983) *Post. Biochem.* 29: 227-238
3. Jones DA (1998) *Phytochemistry* 47: 155-162
4. Dziewanowska K, Niedźwiedź I, Chodelska I, Lewak S (1979) *Physiol Veg* 17: 297-303
5. Eck HV, Hageman RH (1974) 14: 283-287
6. Lewak S (1995) *Kosmos* 44: 601-622
7. Seigler DS (1991) W: Rosenthal GA, Bernbaum MR (red) *Herbivores, their interactions with secondary plant metabolites*, t. 1. Academic Press, San Diego, str. 35-77
8. Selmar D, Grochowski S, Seigler DS (1990) *Plant Physiol* 93: 631-636
9. Kende H (1993) *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 44: 283-307
10. Kakes P (1990) *Euphytica* 48: 25-43
11. Trione EJ (1960) *Phytopath* 50: 482-486
12. Stochmal A, Oleszek W (1997) *J Agr Food Chem* 45: 4333-4336
13. Oomah B, Mazza G, Kenaschuk EO (1992) *J Agric Food Chem* 40: 1346-1349
14. Robinson ME (1930) *Biol Rev* 5: 126-141
15. Jones DA (1972) W: Harborne JB (red.) *Phytochemical Ecology*, Academic Press, London and New York, str. 103-124
16. Jones DA, Keymer RJ, Ellis M (1978) W: Harborne JB (red.) *Aspects of Plant and Animal Coevolution*, Academic Press, London and New York, str. 21-34
17. Swain E, Poulton JE (1994) *Plant Physiol* 106: 437-445
18. Bennett RN, Wallsgrave RM (1994) *New Phytol* 127: 617-633
19. Nahrstedt A (1985) *Pl Syst Evol* 150: 35-47
20. Hruska AJ (1988) *J Chem Ecol* 14: 2213-2217
21. Lieberei R, Biehl B, Giesemann A, Junqueira NTV (1989) *Plant Physiol* 90: 33-36
22. Poulton P (1990) *Plant Physiol* 94: 401-405
23. Halkier BA, Scheller HV, Moller BL (1988) W: *Cyanide Compounds in Biology*, Ciba Foundation Symposium No 140, John Wiley and Sons, Chichester, UK, pp 49-66
24. Halkier BA, Olsen CE, Moller BL (1989) *J Biol Chem* 264: 19487-19494
25. Halkier BA, Moller BL (1990) *J Biol Chem* 265: 21114-21121
26. Halkier BA, Moller BL (1991) *Plant Physiol* 86: 711-716
27. Koch B, Nielsen VS, Halkier BA, Olsen CE, Moller BL (1992) *Arch Biochem Biophys* 292: 141-152
28. Du L, Bokanga M, Moller BL, Halkier BA (1995) *Phytochemistry* 39: 323-326
29. Bennet RN, Kiddle G, Wallsgrave RM (1997) *Phytochemistry* 45: 59-66
30. Halkier BA, Lykkesfeldt J, Moller BL (1991) *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 487-491
31. Cutler AJ, Strenberg M, Conn EE (1985) *Arch Biochem Biophys* 238: 272-279
32. Collinge DB, Hughes MA (1984) *Plant Sci Lett* 34: 119-125
33. Moller BL, Poulton JE (1993) W: *Methods in Plant Biochemistry*, Lea PJ (red.), t. 9 Academic Press, London, str. 183-207
34. Selmar D, Lieberei R, Biehl B, Conn EE (1989) *Physiol Plant* 75: 97-101
35. Selmar D, Lieberei R, Biehl B (1988) *Plant Physiol* 86: 711-716
36. Kakes P, Hakvoort H (1992) *Phytochemistry* 31: 1501-1505
37. Nahrstedt A, Rockenbach J (1993) *Phytochemistry* 34: 433-436
38. McMahon J, White WLB, Sayre RT (1995) *J Exp Bot* 46: 731-741
39. Hughes MA, Brown K, Pancoro A, Murray BS, Oxtoby E, Hughes J (1992) *Arch Biochem Biophys* 295: 273-279
40. Oxtoby E, Dunn MA, Pancoro A, Hughes MA (1991) *Plant Mol Biol* 17: 209-219
41. Selmar D, Lieberei R, Biehl B, Voigt J (1987) *Plant Physiol* 83: 557-563
42. Yeoh H-H, Yeoh Y-C (1994) *Phytochemistry* 35: 1391-1393
43. Mkpung OE, Yan H, Chism G, Sayre RT (1990) *Plant Physiol* 93: 176-181
44. Fann TW-M, Conn EE (1985) *Arch Biochem Biophys* 243: 361-373

45. Selmar D (1993) W: *Biochemistry and Molecular Biology of  $\beta$ -Glucosidases*, red. Esens, ASC press, Washington, 191-204
46. Hickel A, Hasslacher M, Griengl H (1996) *Physiol Plant* **98**: 891-898
47. Conn EE (1980) *Ann Rev Plant Physiol* **31**: 433-451
48. Swain E, Li Ch P, Poulton JE (1992) *Plant Physiol* **100**: 291-300
49. Jorns M (1979) *J Biol Chem* **254**: 12145-12152
50. Cheng I-P, Poulton JE (1993) *Plant Cell Physiol* **34**: 1139-1143
51. Muller E, Nahrstedt A (1990) *Planta Med* **56**: 612
52. Wajant H, Forster S, Bottinger H, Effenberger F, Pfizenmayer K (1995) *Plant Sci* **103**: 1-11
53. Wajant H, Forster S, Selmar D, Effenberger F, Pfizenmayer K (1995) *Plant Physiol* **109**: 1231-1238
54. Hasslacher M, Schall M, Hayn M, Griengl H, Kohlwein SD, Schwab H (1996) *J Biol Chem* **271**: 5884-5891
55. Hughes J, Carvalho FJPC, Hughes MA (1994) *Arch Biochem Biophys* **311**: 496-502
56. Kuroki GW, Conn EE (1989) *Proc Natl Acad Sci USA* **86**: 6978-6981
57. Hughes MA (1991) *Heredity* **66**: 105-115
58. Hughes MA, Stirling JD (1982) *Euphytica* **31**: 477-483
59. Maher EP, Hughes MA (1973) *Biochem Genet* **8**: 13-26
60. Collinge DB, Hughes MA (1982) *Arch Biochem Biophys* **218**: 38-45
61. Hughes MA, Conn EE (1976) *Phytochemistry* **15**: 687-701
62. Dunn MA, Hughes MA, Sharif AL (1988) *Arch Biochem Biophys* **260**: 561-568
63. Tolley SP, Barret TE, Suresh CG, Hughes MA (1993) *J Mol Biol* **229**: 791-793
64. Hughes MA, Sharif AL, Dunn MA, Oxtoby E, Pancoro A (1990) *Plant Mol Biol* **14**: 407-414
65. Lieberei R, Nahrstedt A, Selmar D, Gasparotto L (1986) *Phytochemistry* **25**: 1573-1578
66. Niedźwiedź-Siegień I (1998) *Phytochemistry* **49**: 59-63
67. Collinge DB, Hughes MA (1982) *J Exp Bot* **33**: 154-161
68. Vickery PJ, Wheeler JL, Mulcahy C (1987) *Aust J Agric Res* **38**: 1053-1059
69. Forslund K, Jonsson L (1997) *Physiol Plant* **101**: 367-372
70. Nambisan B, Sundaresan S (1994) *J Sci Food Agric* **66**: 503-507
71. Gruhnert Ch, Biehl B, Selmar D (1994) *Planta* **195**: 36-42
72. Kojima M, Poulton JE, Thayer SS, Conn EE (1979) *Plant Physiol* **63**: 1022-1028
73. Hrazdina G, Wagner GJ (1985) *Annu Proc Phytochem Soc Europe* **25**: 120-133
74. Wink M (1997) *Adv Bot Res* **25**: 141-168
75. Hughes J, Hughes MA (1994) W: *DNA Sequence — The J of Sequencing and Mapping*, t5, str. 41-49, Harword Academic Publishers GmbH
76. Frehner M, Conn EE (1987) *Plant Physiol* **84**: 1296-1300
77. Mkpogon OE, Yan H, Chism G, Sayre RT (1990) *Plant Physiol* **93**: 176-181
78. Kurzhals C, Grutzmacher H, Selmar D, Biehl B (1989) *Planta Medica* **55**: 673
79. Kakes P (1985) *Planta* **166**: 156-160
80. Thayer S, Conn EE (1981) *Plant Physiol* **67**: 617-622
81. Wajant H, Riedel D, Benz S, Mundry K-W (1994) *Plant Sci* **103**: 145-154
82. Swain E, Poulton JE (1994) *Plant Physiol* **106**: 437-445
83. Selmar D (1993) *Planta* **191**: 191-199
84. Selmar D, Lieberei R, Junqueira N, Biehl B (1991) *Phytochemistry* **30**: 2135-2140
85. Selmar D (1989) *Plant Physiol (suppl.)* **86**: 193
86. Selmar D (1994) *Acta Horticulture* **375**: 61-67
87. Selmar D, Irandoost Z, Wray V (1996) *Phytochemistry* **43**: 569-572
88. Frehner M, Scalet M, Conn EE (1990) *Plant Physiol* **94**: 28-34
89. Grutzmacher H, Biehl B, Czygan F, Selmar D (1990) *Planta Medica* **56**: 610-611
90. Swain T (1977) *Ann Rev Plant Physiol* **28**: 479-501

## W. Mejbbaum-Katzenellenbogen's Molecular Biology Seminars

### 6. Liposomes and Related Structures

Wrocław/Szklarska Poręba, Poland, June 10-12, 1999

Info: Prof. Arkadiusz Kozubek

University of Wrocław, Inst. Biochemistry and Molecular Biology,

Department Lipids and Liposomes,

ul. Przybyszewskiego 63/77,

PL-51-148 Wrocław, Poland

Fax (48) +71 3252-930

E-mail: kozubek@angband.microb.uni.wroc.pl

WWW: [http://angband.microb.uni.wroc.pl/biochem/sem\\_99.htm](http://angband.microb.uni.wroc.pl/biochem/sem_99.htm)

# Rola proteaz szoku termicznego w usuwaniu zdenaturowanych białek z komórek *E. coli*

## A role of heat-shock proteases in removal of denatured proteins from *E. coli* cells

EWA LASKOWSKA<sup>1</sup>,  
ALINA TAYLOR<sup>2</sup>

### Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Cytoplazmatyczne proteazy szoku termicznego zależne od ATP i stymulowane przez substraty
  - II-1. Proteaza Lon
  - II-2. Udział proteaz Clp w degradacji i naprawie uszkodzonych białek
  - II-3. Zależna od ATP proteaza ClpYQ (Hs1VU)
- III. Rola periplazmatycznej proteazy HtrA, niezależnej od ATP
- IV. Błonowa proteaza FtsH (Hf1B)
- V. Zakończenie: charakter substratów

**Wykaz stosowanych skrótów:** aa — aminokwasy; Hsps — białka szoku termicznego; IM — błona cytoplazmatyczna; OM — błona zewnętrzna.

### I. Wstęp

Nagły wzrost temperatury powoduje denaturację i agregację białek w komórkach prokariotycznych [1-4] i eukariotycznych [5-7]. King i wsp. [8] stwierdzili, że nawet te białka które, w postaci dojrzałej są termostabilne, ulegają agregacji, ponieważ ich intermediały fałdowania są termolabilne.

Kucharczyk i wsp. [1] wykazali jako pierwsi, że agregaty zdenaturowanych, naturalnych białek komórkowych można izolować z *Escherichia coli* jako odrębną frakcję (frakcję S) metodą ultrawierowania w gradiencie gęstości sacharozy. Pozwala to śledzić proces powstawania i zanikania frakcji zagregowanych białek *in vivo* zależnie od genotypu komórek i warunków doświadczenia. Maksimum frakcji S w komórkach dzikich, *E. coli* WT, otrzymuje się po 15 min od momentu przeniesienia bakterii z 30°C do 45°C. Frakcja S zanika w ciągu 10 min w 37°C (Ryc. 1). Proces usuwania tych agregatów z komórek *E. coli* jest funkcją odpowiedzi stresowej [1], której indukcja znajduje się pod kontrolą białka  $\sigma^{32}$ , produktu genu *rpoH* (*htpR*) [9, 10]. W komórkach *rpoH*, frakcja S jest stabilna, nie zanika nawet w ciągu 45 min [1]. W dra-

### Contents:

- I. Introduction
- II. Cytoplasmic ATP-dependent and substrate stimulated heat-shock proteases
  - II-1. Degradation of abnormal proteins by Lon protease
  - II-2. Role of Clp protease degradation and refolding of damaged proteins
  - II-3. ATP-dependent ClpYQ (Hs1VU) protease
- III. Role of ATP-independent periplasmic HtrA protease
- IV. Membrane protease FtsH (Hf1B)
- V. Conclusions: properties of substrates

stycznych warunkach (42°C, 1 godz) powstają widoczne w mikroskopie elektronowym, ciała inkluzyjne [2]. Mogą one powstawać w różnych przedziałach komórki, w cytoplazmie lub periplazmie i zależnie od tego wykazywać różną morfologię, jak to stwierdzono na przykładzie  $\beta$ -laktamazy w komórkach *E. coli* [11].

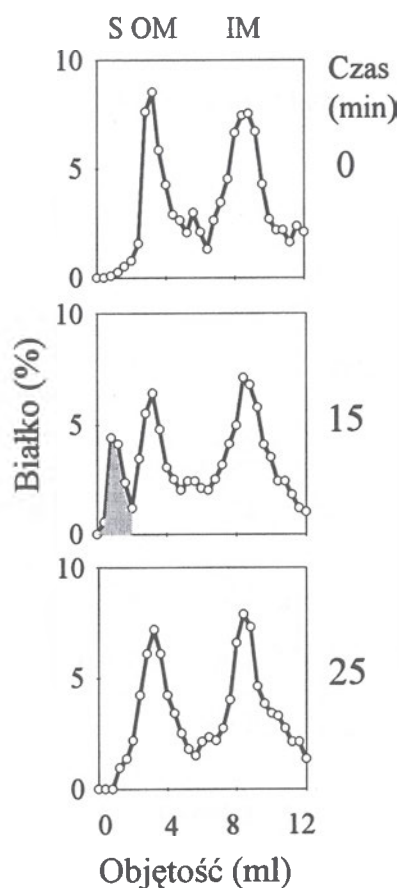
Pojawienie się w komórce nieprawidłowych dla niej polipeptydów stanowi sygnał indukujący odpowiedź stresową, powoduje wzmożoną syntezę Hsps (*Heat shock proteins*), [12-17]. Polipeptydami nieprawidłowymi dla komórki są białka o nie-natywnej konformacji jak produkty zmutowanych genów lub klonowanych obcych genów a także białka zdenaturowane działaniem różnych czynników lub nieprzetworzone (*unprocessed*) prekursorzy białek błonowych [16].

W warunkach fizjologicznych, Hsps są syntetyzowane na poziomie konstytutywnym [18]. Biorą one udział w fałdowaniu nowo-syntetyzowanych polipeptydów [19, 20], transporcie białek przez błony [21], w tworzeniu funkcjonalnych kompleksów białek i w rozpadzie takich kompleksów [14], które np. muszą być odnawiane w każdym cyklu komórkowym. Uczestniczą też w specyficznej proteolizie niektórych białek regulacyjnych [22-24].

Pojawienie się po szoku termicznym dużej ilości zdenaturowanych białek (frakcja S) niewątpliwie wyczerpuje pulę Hsps pochodzących z syntezy konstytutywnej, co sprzyja przejściowemu tworzeniu się agregatów białek komórkowych i stwarza zapotrzebowanie na indukowaną syntezę Hsps. Po podwyższeniu temperatury hodowli następuje także denaturacja i agre-

<sup>1</sup> Dr, <sup>2</sup> prof. dr hab., Katedra Biochemii, Pracownia Biochemii Bakteryjnej, Uniwersytet Gdański, ul. Kładki 24, 80-822 Gdańsk





Ryc. 1. Powstawanie i zanikanie frakcji S w komórkach *E. coli* MC4100 (WT) po szoku termicznym.

Bakterie hodowano w bogatej pożywce (LB), w 30°C do  $OD_{575} = 0,25$ , a następnie przenoszono do 45°C na 15 min (czas 0). Dalszą inkubację prowadzono w 37°C. Po prawej stronie wykresów zaznaczono czas pobrania prób, które po łagodnej lizie frakcjonowano metodą ultrawierowania w gradiencie stężeń sacharozy. Po ultrawierowaniu zbierano 30 frakcji, w których oznaczano stężenie białka. Szczyty odpowiadające błonie zewnętrznej (OM) i cytoplazmatycznej (IM) oznaczono nad wykresami, a frakcję S zacieniowano (wg Laskowskiej i wsp. [57]).

gacja podjednostki  $\sigma^{70}$  polimerazy RNA, która kontroluje transkrypcję z promotorów większości genów *E. coli*. Białko to traci aktywność [25], podczas gdy rdzeń polimerazy RNA pozostaje zdolny do inicjacji transkrypcji jeżeli zostanie uzupełniony alternatywną podjednostką  $\sigma$  [25]. Podjednostka  $\sigma^{32}$ , regulator odpowiedzi stresowej, jest mniej wrażliwa na działanie podwyższonej temperatury, a rozpoznaje tylko promotory genów szoku termicznego. Dzięki temu następuje zahamowanie ekspresji genów *E. coli* transkrybowanych z promotorów rozpoznawanych przez podjednostkę  $\sigma^{70}$  i indukcja transkrypcji z promotorów szoku termicznego [26].

Zadaniem białek opiekuńczych (*molecular chaperones*), w warunkach stresowych jest ochrona polipeptydów przed nieodwracalną denaturacją, zapobieganie agregacji, ułatwianie dysocjacji powstałych nieaktywnych agregatów i przywracanie natywnej konformacji (*refolding*), co wielokrotnie udowodniono *in vivo* i *in vitro*. Przykładem może być działanie systemów białek DnaK/DnaJ/GrpE i GroEL/GroES *in vitro*. Wykazano, że chronią one różne białka modelowe (luciferazę,

polimerazę RNA, rodanazę), przed termiczną inaktywacją i umożliwiają renaturację ich aktywności enzymatycznych [4, 27-29] lub zapobiegają agregacji [30, 31]. Hsps, o których mowa działają we wczesnych etapach fałdowania. Zarówno u *Prokaryota* [17] jak i u *Eukaryota* [32, 33] w późnych etapach fałdowania nowo-syntetyzowanych polipeptydów i naprawy uszkodzonych białek, mogą uczestniczyć modulatory fałdowania, enzymy katalizujące utlenianie, redukcję i izomeryzację (tasowanie) wiązań dwusiarczkowych oraz enzymy izomeryzujące wiązania peptydowe reszt proliny. Visick i Clarke [17] sugerują, że periplazmatyczne izomeryzatory dwusiarczkowe DsbA i DsbC mogłyby uczestniczyć jako system naprawczy w reoksydacji białek periplazmatycznych, w których mostki dwusiarczkowe uległy redukcji. Jednym z białek które podobną funkcję mogłoby pełnić w cytoplazmie jest DnaJ, które jak się niedawno okazało posiada aktywność izomeryzatory dwusiarczkowej [34]. W komórce *E. coli* zidentyfikowano co najmniej 8 peptydylo-prolylo *cis/trans* izomerazy [35]. Należy do nich znany od dawna czynnik TF (*trigger factor*), o którym przypuszczano, że stymuluje wiązanie substratów polipeptydowych z GroEL [36]. TF wiąże się z wylaniającą się z rybosomu częścią N-terminalną białka chroniąc ją przed nieprawidłowym fałdowaniem dopóki nie jest zsintetyzowany cały łańcuch polipeptydowy [37].

Czynniki stresowe mogą uszkodzić strukturę polipeptydów w takim stopniu, że działanie białek opiekuńczych oraz enzymów katalizujących utlenianie grup tiolowych i izomeryzujących resztę proliny nie może przywrócić im natywnej konformacji. Obecność w komórce nieprawidłowych białek mogłaby być szkodliwa ze względu na możliwość oddziaływania z białkami funkcjonalnymi i blokowania ich funkcji. Nie-normalne białka stają się więc substratami proteaz szoku termicznego. Okres półtrwania większości białek *E. coli* w porównaniu z czasem generacji (30-45 min) jest długi: 5-20 godz. Natomiast białka nieprawidłowe są szybko rozpoznawane i degradowane ( $t_{1/2} = 1-20$  min) [15].

Wydaje się dotychczasowa klasyfikacja białek rodziny Hsps na białka opiekuńcze i proteazy szoku termicznego ma znaczenie tylko formalne, gdyż wykazano ostatnio na szeregu przykładów, że np. ATPazy Clp i ich homologi eukariotyczne, stanowiące podjednostki kompleksów proteolitycznych mają aktywność opiekuńczą niezależnie od ich roli w tych kompleksach [38-41]. Uważa się obecnie, że aktywność opiekuńcza podjednostek ATP-azowych umożliwia prezentację substratów podjednostkom proteolitycznym. Inne Hsps przypuszczalnie spełniają podobną rolę gdyż już we wczesnych pracach stwierdzono, że mutanty *E. coli* *dnaK*, *dnaJ*, *grpE* są defektywne pod względem proteolizy nienormalnych białek [43,46]. Można więc sobie wyobrazić, że w komórce po szoku termicznym współzawodniczą ze sobą procesy renaturacji i proteolizy oraz, że renaturacja wykorzystuje ten sam układ, który

zapewnia fałdowanie białek skoordynowane z ich biosyntezą.

Tabela 1

## II. Cytoplazmatyczne proteazy szoku termicznego zależne od ATP i stymulowane przez substrat

W warunkach szoku termicznego w komórkach *E. coli* indukowane są conajmniej trzy cytoplazmatyczne systemy proteolityczne zależne od ATP i stymulowane przez substraty: Lon, ClpAP, ClpXP i nowo odkryty ClpYQ (Tab. 1) [15, 23, 24, 47-49].

### II-1. Proteaza Lon

Lon jest proteazą serynową, produktem genu *lon*, znajdującego się pod kontrolą  $\sigma^{32}$  [47, 50-52]. Aktywna forma jest multimerem składającym się z podjednostek o masie 88 kDa. W zależności od stosowanych systemów ekspresji *lon* uzyskiwano multimery złożone z czterech lub ośmiu podjednostek [53]. Lon jest endopeptydazą, która w obecności ATP i jonów  $Mg^{2+}$  *in vitro* degraduje białka do peptydów składających się z 10 do 20 aa (*amino acids*) [47].

W każdej podjednostce proteazy oprócz centrum proteolitycznego enzymu znajduje się miejsce allosteryczne wiążące substrat [47, 53]. Związanie ATP przez Lon powoduje zmianę konformacji enzymu i „otwarcie” miejsca proteolitycznego, natomiast hydroliza ATP powoduje „zamknięcie” miejsca proteolitycznego; inaczej ujmując, wg Goldberga i wsp., forma enzymu związana z ATP jest „aktywna”, a związana z ADP jest „nieaktywna” [52]. Przyłączenie substratu w miejscu allosterycznym powoduje wymianę ADP na ATP, na tym więc polega mechanizm stymulacji aktywności proteazy. W tetramerze podjednostki Lon działają parami, wykonując, jak się przypuszcza, na zmianę cięcia proteolityczne.

Szczególną cechą Lon i innych proteaz szoku termicznego jest rozpoznawanie nie tylko białek zdenaturowanych w efekcie szoku termicznego, lecz także pewnych białek natywnych.

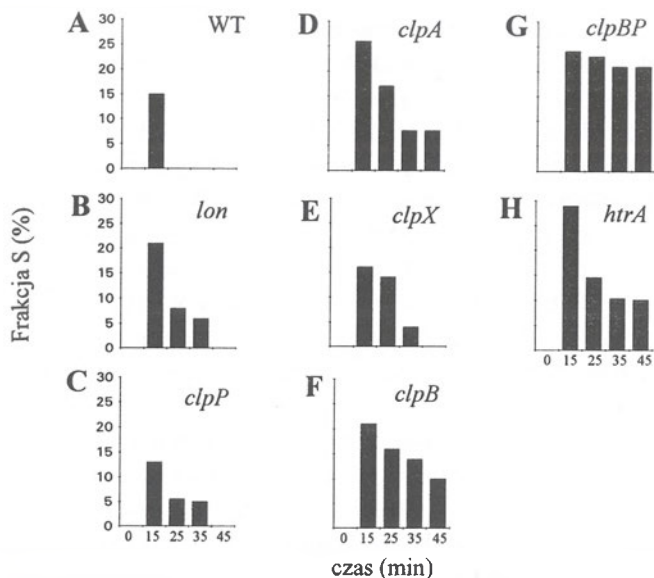
Informacje o funkcji fizjologicznej Lon i jej naturalnych substratach, mimo obszernych badań nad tym enzymem, są dość ograniczone. Poznanymi dotąd naturalnymi substratami Lon są: SfiA (SulA) (inhibitor podziału komórek indukowany w systemie SOS), RscA (pozytywny regulator transkrypcji genów odpowiedzialnych za syntezę polisacharydów otoczkowych), transpozaza Tn903, anty-terminatorowe białko N faga  $\lambda$ , oraz kodowane przez plazmid F białko CcdA, które blokuje działanie CcdB, inhibitora gyrazy [47, 48, 54]. Warto dodać, że w przeciwieństwie do kompletnego białka, skrócona forma CcdA, CcdA41, nie posiadająca stabilnej struktury drugorzędowej, może być degradowana w obecności analogów ATP nie ulegających hydrolizie. Według autorów sugeruje to, że hydroliza ATP może prowadzić do zmiany

## Proteazy szoku termicznego

Proteazy	Forma aktywna
cytoplazmatyczne zależne od ATP:	
Lon	tetramer
Clp	heptamer
białka opiekuńcze	heksamer
ClpA	oligomer (heksamer?)
ClpX	
ClpB	
Clp	heksamer
białko opiekuńcze?	heksamer (heptamer?)
ClpY	
proteaza błony IM zależna od ATP	
FtsH (HflB)	multimer ?
periplazmatyczna niezależna od ATP	
HtrA	tetramer

konformacji CcdA umożliwiającej proteolizę. Degradacja CcdA, kazeiny i  $\lambda$ N jest hamowana przez białko faga T4 PinA, które wiąże się z proteazą w miejscu innym niż wcześniej opisane miejsca funkcyjne [55, 56]. Prawdopodobnie PinA hamuje hydrolizę ATP uniemożliwiając zmiany konformacji Lon i rozwinięcie substratu warunkujące proteolizę.

Do degradowanych przez Lon *in vivo* zmienionych białek komórki należą produkty zmutowanych genów, białka zawierające analogi aa oraz fragmenty puromycynowe białek, które powstają w wyniku włączenia puromycyny — analogu aminoacylo-tRNA, co powoduje przedwczesną terminację łańcucha polipeptydowego [47, 48]. Dane te oraz fakt, że transkrypcja *lon* znajduje się pod kontrolą  $\sigma^{32}$ , wskazywały, że rolą proteazy Lon po szoku termicznym jest degradacja zdenaturowanych białek. Potwierdzają to nasze doświadczenia, z których wynika, że w komórkach



Ryc. 2. Powstawanie i zanikanie frakcji S w komórkach mutantów pozbawionych aktywności proteolitycznych.

Warunki doświadczenia opisano pod ryciną 1. Na wykresach przedstawiono w %-tach zawartość białka w frakcji S w odniesieniu do sumy białek nierozpuszczalnych (OM+IM+S = 100 %) (na podstawie pracy Laskowskiej i wsp. [57]).

mutanta *lon* frakcja S jest większa i jej usunięcie wymaga dłuższego czasu niż w komórkach WT [57] (Ryc. 2-B). Stwierdzono jednak, że proteaza ta nie jest niezbędna do wzrostu i przeżycia bakterii w podwyższonej temperaturze [58-60] co nie jest zaskakujące, ponieważ funkcje kilku systemów proteolitycznych występujących u *E. coli* mogą pokrywać się wzajemnie.

## II-2. Udział proteazy Clp w degradacji i naprawie uszkodzonych białek

Zależną od ATP proteazę Clp tworzą podjednostka ClpP (21,5 kDa) z aktywnym centrum proteolitycznym proteazy serynowej i podjednostki ClpA (84 kDa) lub ClpX (46,3 kDa), które posiadają aktywność ATPaz [48, 49, 61, 62].

ClpP jest cytoplazmatycznym białkiem szoku termicznego syntetyzowanym jako prekursor składający się z 207 aa [63]. Forma dojrzała powstaje po autokatalitycznym odcięciu N-terminalnego, złożonego z 14 aa, propeptydu [64]. *In vitro* ClpP samodzielnie hydrolizuje bardzo krótkie peptydy (3-6 aa). Do degradacji dłuższych peptydów i białek konieczna jest dostępność ATP oraz współdziałanie ClpP z podjednostkami ClpA lub ClpX swoiście rozpoznającymi i prezentującymi substrat kosztem hydrolizy ATP [48, 65, 66].

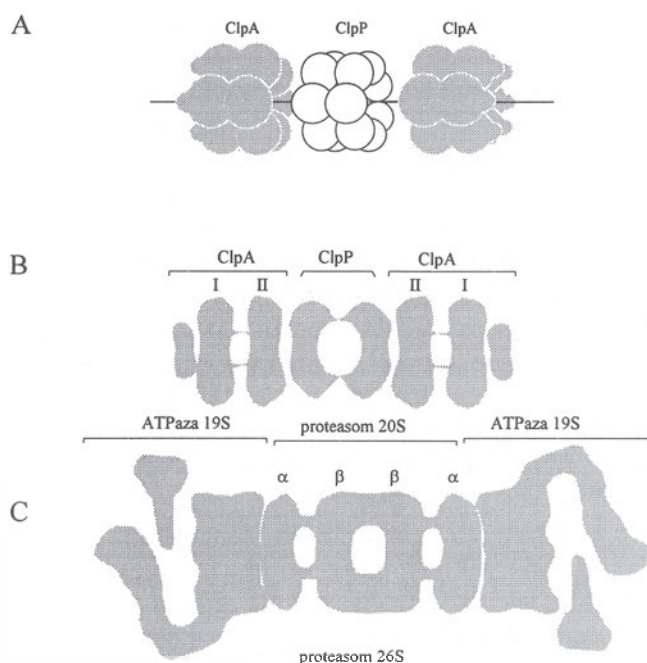
ClpA jest jednym z silnie konserwowanych białek rodziny Hsp100, obecnych u *Prokaryota* i *Eukaryota* [47, 67] ale w przeciwieństwie do pozostałych przedstawicieli tej rodziny (jak ClpB i Hsp104) nie jest białkiem Hsps [63]. W strukturze ClpA można wyróżnić dwie domeny: I (N-terminalną) i II (C-terminalną), z których każda posiada miejsce wiążące ATP [68, 69]. Przyłączenie ATP do I domeny umożliwia powstanie

heksameru ClpA i utworzenie kompleksu z ClpP, natomiast związanie i hydroliza ATP w II-giej domenie jest niezbędna do proteolizy dużych białek [70].

Aktywny kompleks ClpAP otrzymano *in vitro* po zmieszaniu oczyszczonych białek ClpA (ATP-aza) i ClpP (peptydaza), w obecności ATP i  $Mg^{2+}$ . ClpP tworzy multimer złożony z 14 podjednostek uporządkowanych w dwa pierścienie, siedmioczłonowe przylegające do siebie wzdłuż osi symetrii. Z jednej lub z obu stron tetradekameru ClpP zasocjowane są heksameryczne pierścienie ClpA (Ryc. 3). Autorzy [69], omawiają podobieństwo struktury ClpAP do eukariotycznego proteasomu 26S, w którym można wyróżnić część proteolityczną (proteasom 20S) i kompleks 19S zawierający ATPazę [71] i sugerują, że z podobieństwa struktury wynika podobny mechanizm działania obu typów proteaz.

ClpAP degraduje szereg białek fuzyjnych między innymi z  $\beta$ -galaktozydazą jak ClpA- $\beta$ -galaktozydaza [68]. Inną grupę substratów ClpAP stanowią białka posiadające na końcu aminowym jeden z aa: fenyloalaninę, leucynę, tryptofan lub tyrozynę. Zgodnie z zasadą końca aminowego białek (*the N-end rule*) aa te są charakterystyczne dla niestabilnych polipeptydów [72]. Białka eukariotyczne zawierające takie aa na końcu aminowym ulegają proteolizie z udziałem proteasomu 26S po wcześniejszym oznakowaniu ubikwityną [15]. Oprócz miejsc wiążących ATP w podjednostce ClpA znajduje się allosteryczne miejsce, do którego przyłącza się substrat. Rolą ClpA jest prezentacja substratu oraz wywołanie zmian konformacyjnych w ClpP, tak aby centra proteolityczne monomerów ClpP stały się dostępne dla substratów [66].

S i n g h i M a u r i z i [70] zaproponowali hipotezę, że domena I ClpA pełni funkcję opiekuńczą ułatwiając



Ryc. 3. Model kompleksu ClpAP (A) i schematy ClpAP (B) i proteasomu 26S (C) na podstawie zdjęć z mikroskopu elektronowego (wg Kessel i wsp. [69]).

odzyskanie natywnej konformacji związanym substratem co chroniłoby je przed proteolizą. W przypadku uszkodzenia struktury białka w stopniu uniemożliwiającej renaturację, substrat byłby przekazywany do domeny II, a następnie do centrum aktywnego ClpP do degradacji. Argumentów na korzyść tej hipotezy dostarczyli Wickner i wsp. [73] wykazując, że ClpA, podobnie jak DnaK i DnaJ, aktywuje *in vitro* białka RepA (kontrolujące inicjację replikacji plazmidu P1), co polegało na przekształceniu nieaktywnego dimeru RepA w aktywne monomery. Reakcji towarzyszyła hydroliza ATP. Stwierdzono ponadto, że do aktywacji RepA wystarcza jeden cykl wiązania substratu z ClpA [74]. Dalszym potwierdzeniem roli opiekuńczej ClpA była ochrona lucyferazy przed termiczną inaktywacją [73].

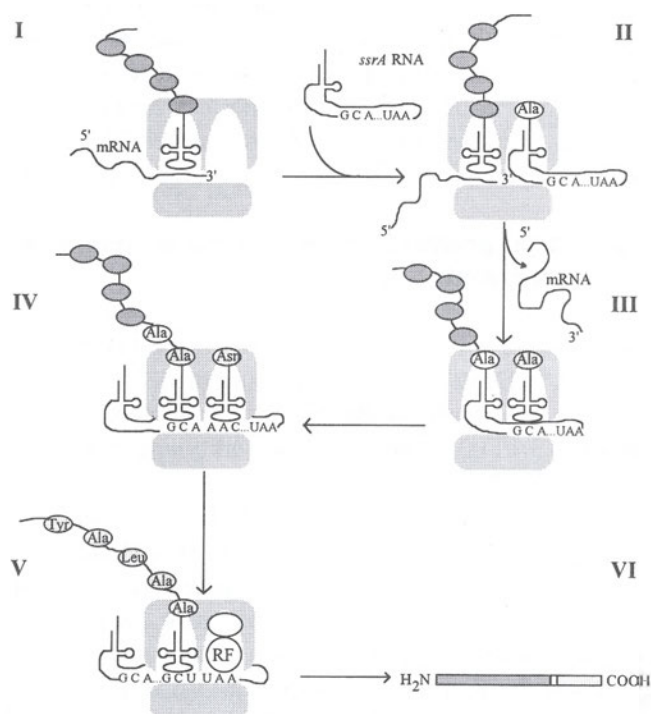
Funkcję białka opiekuńczego może pełnić również inna współdziałająca z ClpP podjednostka, ATPaza ClpX. Kompleks ClpXP, wykazuje strukturę analogiczną do ClpAP [75]. Poznanymi dotąd naturalnymi substratami proteazy ClpXP są fagowe białko inicjacji replikacji  $\lambda$ O [61, 62] i podjednostka polimerazy RNA  $\sigma^S$  kontrolująca poziom transkrypcji w stacjonarnej fazie wzrostu *E. coli* [76]. Substratem ClpXP jest również Phd, które działa jako antidotum dla toksycznego białka Doc [77]. Phd i Doc kodowane są przez plazmid P1 i stanowią mechanizm zwiększający stabilność plazmidu P1 w komórce. ClpXP nie degraduje kazeiny i białek fuzyjnych z  $\beta$ -galaktozydazą, które są substratami proteazy ClpAP. Wyniki te sugerują, że podjednostki ClpA i ClpX decydują o rozpoznaniu substratu dla podjednostki proteolitycznej ClpP [78, 61, 62]. Nie wyklucza to jednak możliwości istnienia substratów wspólnych dla obu proteaz.

W tym miejscu warto zwrócić uwagę na najnowsze odkrycia dotyczące oznakowania białek przeznaczonych do degradacji w komórkach prokariotycznych [79-81]. Stwierdzono, że białka syntetyzowane na uszkodzonych mRNA jak n.p. niedokończone transkrypty, niezawierające kodonu terminacyjnego, zostają oznaczone przez dodanie jedenasto-aminokwasowego peptydu na końcu karboksylowym. Dedycuje to o skierowaniu ich do proteolizy. Ten sposób oznakowania przypomina znakowanie ubikwityną białek kierowanych do degradacji przez proteasom 26S w komórkach *Eukaryota*. Mechanizm oznakowania jest jednak zupełnie inny. W komórkach *E. coli* znacznik-dekapeptyd ANDENYALAA jest kodowany przez stabilny SsrA RNA (10Sa RNA), produkt genu *ssrA*. SsrA RNA posiada jednocześnie cechy tRNA i m RNA, dlatego zaproponowano alternatywną nazwę tmRNA [82]. SsrA RNA rozpoznaje i wiąże alaninę, jest także zdolny do przenoszenia jej na rybosom, jak tRNA<sup>Ala</sup>. Następuje to, gdy kończy się synteza białka na transkrypcie bez kodonu stopu. Proces ten pozwala na związanie z rybosomem tmRNA tak, że na drodze tzw. „trans-translacji” może zostać odczytana jego domena kodująca dekapeptyd

i zawierająca sygnał terminacji UAA [83]. Ostatecznym wynikiem jest więc kotranslacyjna modyfikacja polegająca na przyłączeniu sygnału kierującego do degradacji, składającego się z 11. aminokwasów (A-ANDENYALAA) i jednocześnie uwolnienie systemu translacyjnego od nienormalnego białka (Ryc. 4).

Wykazano, że ClpAP i ClpXP degradują *in vitro* fragment represora cI faga  $\lambda$ , do którego przyłączono peptyd-znacznik kodowany przez *ssrA* RNA [79, 80]. Ponadto stwierdzono, że również proteaza FtsH (będzie omówiona dalej) rozpoznaje ten sygnał degradacji [81].

ClpX, podobnie jak ClpA, posiada własności opiekuńcze i może działać *in vitro* niezależnie od ClpP chroniąc modelowe białko  $\lambda$ O (białko replikacyjne faga  $\lambda$ ) przed termiczną denaturacją i agregacją [22, 38]. Zagregowane białko  $\lambda$ O ulegało także aktywacji przez ClpX przy jednoczesnej hydrolizie ATP. Doświadczenia nad transpozycją i replikacją faga Mu również potwierdziły rolę opiekuńczą ClpX, niezależną od ClpP. *In vivo* replikacja DNA faga Mu jest zablokowana w komórkach mutantu *clpX*, natomiast mutacja *clpP* nie zakłóca tej replikacji [84]. Wykazano



Ryc. 4. Naznaczanie białek prokariotycznych do degradacji syntetyzowanych na mRNA np. nie zawierającym kodonu terminacyjnego (wg Keilera i wsp. [79]). (I) W trakcie translacji rybosom zatrzymuje się przy końcu 3' uszkodzonego mRNA. (II) Taki kompleks jest rozpoznawany przez alanylo- *ssrA* RNA, który wiąże się w miejscu P rybosomu. (III) Alanina jest dołączana do łańcucha polipeptydowego, a translacja jest kontynuowana z wykorzystaniem fragmentu *ssrA* RNA jako matrycy. (IV) Znacznik — AANDENYALAA zostaje kotranslacyjnie dodany do syntetyzowanego polipeptydu. (V) Przy kodonie terminacyjnym UAA zawartym w *ssrA* RNA (tm RNA) następuje uwolnienie naznaczonego białka (VI), które jest rozpoznawane i degradowane m.in. przez proteazy ClpAP, ClpXP, FtsH. System ten przypomina oznaczanie ubikwityną białek eukariotycznych przeznaczonych do degradacji.

również ze ClpX katalizuje dysocjację tetrameru transpozazy MuA do aktywnych monomerów w reakcji zależnej od ATP i niezależnej od ClpP [85]. W części C-terminalnej transpozazy zidentyfikowano decapeptyd rozpoznawany przez ClpX. Dołączenie tego fragmentu do represora faga P22, białka Arc, powodowało degradację białka fuzyjnego przez ClpXP, mimo że Arc normalnie nie jest substratem tej proteazy [86].

Homologiem ClpA, jak już wspomniano, jest białko szoku termicznego ClpB [87, 88]. O jego roli w komórce wiadomo stosunkowo niewiele. ClpB posiada aktywność ATPazy stymulowaną *in vitro* przez kazeinę i insulinę, nie może jednak zastąpić białka ClpA w degradacji kazeiny przez ClpP [89]. Można więc sądzić, że ClpB współdziała z inną, nieznaną jeszcze podjednostką proteolityczną lub wyłącznie spełnia rolę białka opiekuńczego. Występujące w drożdżach białko Hsp104, homolog ClpB, nie uczestniczyło w degradacji lucyferazy (kodowanej w plazmidzie), ani nie chroniło jej przed termiczną denaturacją, natomiast umożliwiała dezagregację termicznie zdenaturowanego enzymu [60]. Park i w s p. [90] stwierdzili, że gen *clpB* *E. coli* koduje w tej samej ramie odczytu dwa białka o masie 93 kDa (ClpB93) i 79 kDa (ClpB79). Oba posiadają po dwa miejsca wiążące ATP. Zlokalizowane są w cytoplazmie. Jednak *in vitro* kazeina stymulowała tylko aktywność ATPazy ClpB93. Wynik ten sugeruje, że za wiązanie substratu jest odpowiedzialna N-terminalna (148 aa) część ClpB93, której brakuje w ClpB79. Oba białka tworzą prawdopodobnie mieszany tetramer. Okazało się dalej, że ClpB79 hamuje aktywność ATPazy ClpB93. Autorzy sugerują, że ClpB79 reguluje w ten sposób funkcję ClpB93 [90]. Nadal jednak pozostaje do wyjaśnienia szereg pytań na temat mechanizmu działania i roli fizjologicznej obu białek ClpB.

U *Eukaryota* występuje homolog ClpB79, białko mitochondrialne, Hsp78. Jest ono jednak kodowane przez oddzielny gen w odróżnieniu od prokariotycznego *clpB93/79* [40, 91, 92].

W naszych doświadczeniach z odpowiednimi mutantami wykazaliśmy, że brak ClpP lub którejkolwiek podjednostki ATPazowej Clp, hamował w różnym stopniu usuwanie frakcji S z komórek [86] (Ryc. 2 C-F). Wyniki ukazywały ważną rolę białek ClpA i ClpB w tym procesie (odpowiednio 33% i 47% agregatów nieusuniętych po 45 min doświadczenia). Można przypuszczać, że białka te biorą udział w usuwaniu frakcji S jako podjednostki proteaz rozpoznające i prezentujące substraty, lub/i jako białka opiekuńcze renaturujące zdenaturowane polipeptydy. Stwierdziliśmy szczególnie silny efekt podwójnej mutacji *clpBP*. W komórkach takiego mutantu pozostawało prawie 90% nieusuniętych agregatów frakcji S w 45. minucie doświadczenia (Ryc. 2-G). W przybliżeniu jest to suma efektów wywołanych przez brak każdego z tych białek osobno (Ryc. 2 C, F). Potwierdza to wspomniany już wynik innych autorów [47, 89]

uzyskany odmienną techniką, że ClpB i ClpP nie tworzą aktywnego kompleksu.

### II-3. Zależna od ATP proteaza ClpYQ (HslVU)

ClpYQ jest wykrytą niedawno, proteazą zależną od ATP, złożoną z produktów genów *clpQ* (*hslV*) i *clpY* (*hslU*), znajdujących się pod kontrolą podjednostki  $\sigma^{32}$  [93-95]. Białko ClpQ (19 kDa) posiada aktywność peptydazy stymulowanej przez ATPazę, ClpY (50 kDa). Naturalnym substratem tej proteazy jest podjednostka  $\sigma^{32}$  polimerazy RNA, której poziom wzrasta dwukrotnie w szczepie  $\Delta clpYQ$  [96]. Ponadto stwierdzono, że produkt klonowanego genu (ludzka prouokinaza), częściowo tylko sfałdowany, jest bardziej stabilny w komórkach takiego mutantu delecyjnego niż w szczepie dzikim [96] a degradacja fragmentów puromycynowych zachodzi znacznie wolniej [97]. *In vitro* ClpYQ trawi niektóre, krótkie hydrofobowe peptydy [94] oraz fragmenty kazeiny uzyskane w wyniku częściowego trawienia trypsyną [97]. Sekwencja aa ClpQ jest homologiczna do sekwencji podjednostki  $\beta$  proteasomu 20S (28,5%), natomiast sekwencja ClpY jest w 50% identyczna z ClpX [93, 95]. Okazało się także, że aktywność proteolityczna ClpQ i podjednostki  $\beta$  proteasomu ulega specyficznemu hamowaniu przez ten sam syntetyczny inhibitor, pochodną winylo-sulfonową trójpeptydu leucyny [98]. Zdjęcia z mikroskopu elektronowego wykazały, że ClpQ i ClpY tworzą kompleks, którego struktura przypomina strukturę proteazy ClpAP a także eukariotycznego proteasomu 20S [95]. Stwierdzono, ponadto, że w trakcie sączenia molekularnego ClpQ zachowuje się jak oligomer złożony z 12 podjednostek, co jest zgodne z obrazem z mikroskopu elektronowego [99]. Białko ClpY natomiast tworzy kompleks zawierający 8-10 podjednostek, przy czym, podobnie jak w przypadku ClpA, oligomeryzacja ClpY wymaga udziału ATP. Rohrwil d i w s p. [94] przypuszczają, że *in vivo* proteaza ClpYQ, która wykazuje właściwości pośrednie między eukariotycznym proteasomem a proteazą Clp, uczestniczy w degradacji białek uszkodzonych w trakcie szoku termicznego. Sugeruje się również, że ClpYQ może spełniać podobne funkcje jak proteaza Lon ponieważ mutacje *clpYQ* i *lon* wywołują podobny efekt fenotypowy w postaci mukoidalności kolonii. W przypadku komórek *lon* jest to skutek podwyższenia poziomu regulacyjnego białka RscA, które w komórkach dzikich jest substratem proteazy Lon [48, 97].

### III. Rola periplazmatycznej proteazy HtrA, niezależnej od ATP

Białko HtrA (DegP, Do) jest niezależną od ATP proteazą serynową *E. coli*, co zostało udowodnione na podstawie precyzyjnej mutagenyzy zmieniającej centrum aktywne [100]. Proteaza jest syntetyzowana w formie prekursora (51 kDa), z którego po odcięciu

sekwencji liderowej (26 aa) powstaje dojrzała forma białka (48 kDa) [101-106]. Proteaza HtrA jest zlokalizowana w przestrzeni periplazmatycznej jako białko peryferyczne błony wewnętrznej [107]. Aktywność proteolityczna HtrA jest absolutnie niezbędna do wzrostu komórek w temperaturze powyżej 42°C [100].

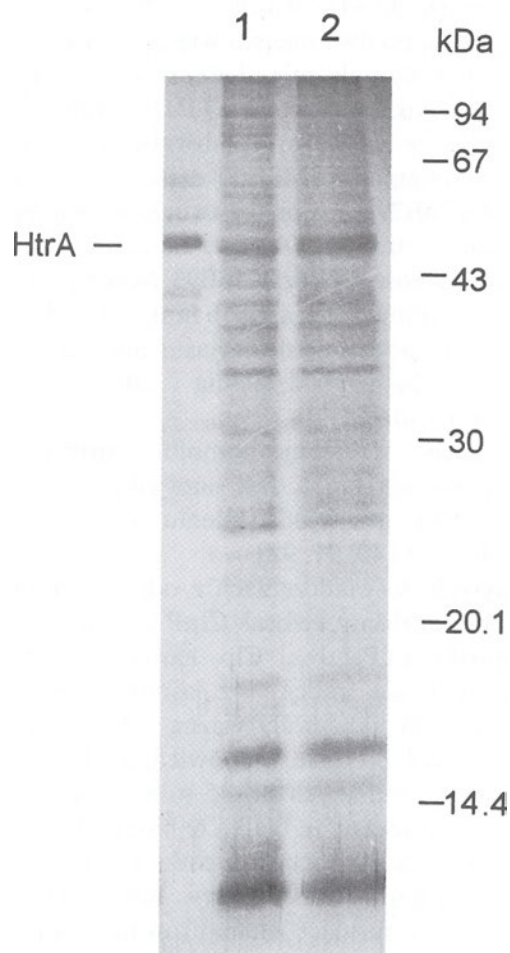
Gen *htrA* *E. coli* należy do regulonu szoku termicznego kontrolowanego przez podjednostkę  $\sigma^{24}$  ( $\sigma^E$ ) polimerazy RNA [10, 101]. Mecsasi i wsp. [108] stwierdzili, że nadprodukcja białek błony zewnętrznej prowadzi do wzrostu aktywności  $\sigma^E$  i w konsekwencji do indukowanej syntezy HtrA. Na tym spostrzeżeniu opiera się sugestia autorów, że regulon  $\sigma^E$  kontroluje procesy zachodzące w periplazmie i błonie zewnętrznej, co jest zgodne także z lokalizacją HtrA [107]. Regulon kontrolowany przez  $\sigma^{32}$  jest odpowiedzialny za zmiany zachodzące w cytoplazmie. Zagadnienie to jest szerzej omówione w pracach przeglądowych [109, 110]. Danese i wsp. (1995) [111] poszukując mutacji, które wpływają na transkrypcję genu *htrA* wykryli dodatkowy element regulujący syntezę HtrA, system CpxAR. Sygnałem, który aktywuje ten system jest wzrost poziomu lipoproteiny NlpE w błonie zewnętrznej *E. coli*. Wzrost syntezy innych lipoprotein nie indukuje transkrypcji *htrA*. Informacja zostaje przekazana za pośrednictwem białka błony cytoplazmatycznej CpxA do regulatora CpxR, który indukuje transkrypcję *htrA*, współdziałając z  $\sigma^E$ . Na razie nie wiadomo, czy Cpx stymuluje transkrypcję również z innych promotorów  $\sigma^E$  czy też *htrA* jest jedynym genem regulowanym przez ten system.

Obserwowano podwyższenie poziomu HtrA w komórkach mutantu *surA*, pozbawionego aktywnej, periplazmatycznej peptydylo-prolylo *cis-trans* izomerazy [112]. Białko SurA uczestniczy w sfałdowaniu białek błony zewnętrznej *E. coli* OmpA, OmpF i LamB. Autorzy sądzą więc, że wzrost poziomu HtrA w komórkach *surA* był spowodowany pojawieniem się nieprawidłowo sfałdowanych białek błony zewnętrznej. Niewykluczone, że i w tym przypadku w indukcji *htrA* uczestniczy system Cpx.

Narazie jedynym zidentyfikowanym naturalnym substratem proteazy HtrA jest acylowana forma prekursora białka uwalniającego kolicynę A [113]. Stwierdzono, poza tym, że mutant *htrA* jest upośledzony w degradacji nieprawidłowych białek periplazmatycznych i błony wewnętrznej [105, 114].

Proteaza HtrA odgrywa ważną rolę w usuwaniu zagregowanych białek frakcji S, co stwierdziliśmy na podstawie doświadczeń *in vivo* i *in vitro* [57]. W komórkach mutantu *htrA63* 35% agregatów zdenaturowanych białek pozostawało nieusuniętych (Ryc. 2-H), w reakcji *in vitro* w 45°C, natomiast 30% białek frakcji S ulegało degradacji przez proteazę HtrA. Doświadczenia *in vitro* z użyciem frakcji S dostarczyły dalszych informacji o charakterze tej reakcji. Proteoliza zagregowanych białek była stymulowana przez jony  $Mg^{2+}$  i wyraźnie hamowana w obecności Hsp, DnaJ.

Hamowanie reakcji proteolizy zagregowanych białek przez DnaJ może oznaczać, że DnaJ chroni przed ekstensywną proteolizą te białka, których denaturacja nie przekroczyła progu wykluczającego ich renaturację. Efekt ten był swoisty w stosunku do agregatów białek z frakcji S i nie występował przy trawieniu przez HtrA substratu nienaturalnego, kazeiny. Z naszych doświadczeń wynika również, że HtrA nie rozpoznaje specyficznych sekwencji aminokwasowych w zagregowanych białkach frakcji S. Można przypuszczać, że rozpoznaje raczej charakterystyczny stan konformacyjny powstający po szoku termicznym ponieważ substratami HtrA są różne białka frakcji S, które w równym stopniu ulegają degradacji, dzięki czemu elektroforegramy białek frakcji S przed i po trawieniu frakcji S przez HtrA nie wykazują różnicy (Ryc. 5). Zaskoczeniem był wynik reakcji trawienia frakcji S izolowanej z mutantu *htrA63* ( $S_{htrA}$ ). Oczekiwano, że frakcja  $S_{htrA}$  zawiera w większości substraty HtrA, które w reakcji *in vitro* zostaną całkowicie strawione. Jednak tylko 6% białek frakcji  $S_{htrA}$  zostało zdegradowanych *in vitro*. Wydaje się więc, że obecność białka HtrA jest niezbędna w momencie przeniesienia



Ryc. 5. Elektroferogramy białek frakcji S przed i po trawieniu *in vitro* proteazą HtrA.

Białka frakcji S (10 µg) były trawione przez HtrA (1 µg) w 20 µl 50 mM Tris-HCL PH 8,0 zawierającego  $MgSO_4$  (10 mM) w 45°C, przez 3 godz. Białka rozdzielano w 15% żelu poliakrylamidowym z 0,1% SDS. Żel barwiono metodą srebrową. Ścieżka 1. — kontrola, 2 — frakcja S trawiona przez HtrA (wg Laskowskiej i wsp. [57]).

bakterii do podwyższonej temperatury, aby utrzymać (w oddziaływaniu pośrednim lub bezpośrednim) substraty HtrA w konformacji umożliwiającej ich rozpoznanie przez tę proteazę.

#### IV. Błonowa proteaza FtsH (HflB)

Zakotwiczone w błonie cytoplazmatycznej białko FtsH posiada dużą C-terminalną domenę cytoplazmatyczną z sekwencjami wiążącymi ATP oraz jony  $Zn^{2+}$ . Domena ta obejmuje 200 aa i jest homologiczna do sekwencji eukariotycznych ATPaz, z klasy AAA (*ATPase associated with various activities*), które uczestniczą w wielu różnych procesach: kontroli cyklu komórkowego, degradacji, sekrecji białek, regulacji transkrypcji i biogenezie organelli komórkowych [24]. Do ATPaz AAA należą między innymi niektóre podjednostki eukariotycznej proteazy 26S [49] oraz metaloproteazy mitochondrialne Yta10, Yta12 i Yta11. Yta10 i Yta12 tworzą w wewnętrznej błonie mitochondrialnej heterooligomer o masie ok. 850 kDa odpowiedzialnych za powstawanie kompleksu syntazy ATP i za proteolizę nadmiaru wolnych podjednostek syntazy, jeżeli nie wejdą w skład kompleksu [115].

Tomoyasu i wsp. [116] wykazali, że FtsH uczestniczy w degradacji podjednostki polimerazy RNA  $\sigma^{32}$ . W komórkach mutantu *ftsH1* wrażliwego na temperaturę poziom  $\sigma^{32}$  był wyższy 4-5-krotnie niż w szczepie dzikim. Stwierdzono również proteolizę  $\sigma^{32}$  katalizowaną przez FtsH *in vitro* w reakcji zależnej od ATP. Kanemori i wsp. [96] sugerują jednak, że za degradację  $\sigma^{32}$  odpowiedzialne są również proteazy cytoplazmatyczne (Lon, ClpXP, ClpYQ). Tak więc przypuszczalnie funkcje FtsH i proteaz cytoplazmatycznych częściowo nakładają się na siebie. Potwierdzają to również doświadczenia *in vitro*, które wykazały degradację przez proteazy Clp i FtsH fuzyjnego białka CI-SsrA, zawierającego fragment represora faga  $\lambda$ , CI i decapeptyd stanowiący sygnał kierujący do degradacji w komórkach prokariotycznych (produkt genu *ssrA*) [81]. Z kolei białko faga  $\lambda$  Xis było substratem proteaz FtsH i Lon [117]. Innym naturalnym substratem FtsH jest regulator transkrypcji faga  $\lambda$ , niestabilne białko cII, którego poziom wewnątrz komórki decyduje o jej lizogenizacji lub wroście litycznym faga  $\lambda$ . W reakcji *in vitro* z udziałem FtsH białko cII ulega proteolizie 10 razy szybciej niż  $\sigma^{32}$ . W przeciwieństwie do  $\sigma^{32}$  degradacja cII nie wymaga udziału białek szoku termicznego DnaK/DnaJ/GrpE [117]. Wykazano, że aktywność FtsH może być regulowana przez białka HslK i HslC, które znajdują się w błonie cytoplazmatycznej po stronie periplazmy i tworzą kompleks z FtsH [119]. *In vitro* HslKC hamuje proteolizę cII oraz degradację podjednostki translokazy SecY [120]. Lokalizacja białek HslKC może wskazywać na istnienie regulacji proteolizy wewnątrzkomórkowej przez sygnały pochodzące z zewnątrz komórki. Wydaje się, że mechanizm regulacji aktyw-

ności FtsH jest bardzo złożony [121]. Wykazano, że białko regulatorowe, cIII stabilizuje cII umożliwiając rozwój lityczny faga  $\lambda$ . Stwierdzono, że poziom cIII wzrasta znacznie w komórkach mutantu  $\Delta ftsH$ , co sugeruje, że cIII jako substrat FtsH, może współzawodniczyć z białkami cII i  $\sigma^{32}$  o miejsce aktywne proteazy, hamując w ten sposób ich proteolizę.

Ostatnie badania nad degradacją mRNA w komórkach *E. coli* wskazują na jeszcze jedną funkcję FtsH. Stwierdzono, że w komórkach *ftsH* niektóre rodzaje mRNA są bardziej stabilne niż w szczepie WT i zasugerowano udział FtsH w aktywacji RNaz przez proteolizę [122]. Innym proponowanym wyjaśnieniem wolniejszej degradacji mRNA w komórkach mutantu jest brak efektywnej degradacji przez FtsH białka (lub białek) stabilizujących mRNA.

#### V. Zakończenie: charakter substratów

Omawiane proteazy są bardzo niezwykłymi enzymami stanowiąc klasę enzymów różniących się znacznie od przykładów klasycznych. Jak wynika z przedstawionych badań różnych zespołów, a także naszego, *in vitro* i *in vivo* proteazy stymulowane przez substraty i zależne od ATP (ClpAP, ClpXP, ClpYQ, Lon) a również niezależna od ATP proteaza HtrA, działając jako enzymy degradujące nienaturalne białka, rozpoznają w nich nie specyficzne sekwencje aminokwasów, lecz odpowiedni stan konformacji. Byłoby bardzo ciekawe znalezienie odpowiedzi na pytanie „jaki?”. Można tylko przypuszczać, że może to być stan określony jako stopiona globuła (kłębek statystyczny, ang. „molten globule”). Określenie to nie jest jednoznaczne. Levitt i wsp. [123] tak opisują ten stan konformacyjny: a) cząsteczka białkowa jest mniej sfałdowana (ang. *less compact*) niż w stanie natywnym ale b) bardziej sfałdowana niż w stanie zdenaturowanym, całkowicie rozfałdowanym, c) posiada znaczne obszary struktur drugorzędowych (przeważa konformacja  $\beta$ -harmonijki), d) wykazuje luźne kontakty trzeciorzędowe bez ścisłego upakowania łańcuchów bocznych aa. Levitt i wsp. zwracają uwagę, że struktura stopionych globułów może być bardzo zróżnicowana, nawet dla tego samego białka można otrzymać stopione globuły o różnej konformacji. Przykładem może być  $\alpha$ -laktoalbumina z której, zależnie od warunków, można otrzymać dwie postacie stopionej globuły [123], istnieją także inne przykłady. Struktura stopionej globuły może odpowiadać chronionym przez Hsps prekursorom dojrzałych białek, których fałdowanie wymaga dalszego udziału Hsps (np. GroEL/ES wg tego samego schematu). Jeżeli tak, to można sądzić, że podany mechanizm działa po szoku termicznym, a zadaniem Hsps jest utrzymanie białek w takiej konformacji, która umożliwiłaby ich renaturację. Można tu podsumować spostrzeżenia na temat właściwości białek frakcji S. Białka te jak wykazano, są substratami proteaz szoku termicznego, jednak tylko

wtedy gdy formują się w obecności Hsps. Natomiast nie jest substratem tych enzymów frakcja S uzyskana z mutantów niezdolnych do indukcji odpowiedzi stresowej *rpoH*, *dnaK*, *dnaJ* lub *htrA* ani frakcja zdenaturowanych białek *E. coli*, którą można uzyskać uwalniając rozpuszczalne białka cytoplazmatyczne i periplazmatyczne przez szok osmotyczny i następnie poddając je denaturacji cieplnej *in vitro* w warunkach analogicznych do wywołujących powstawanie frakcji S (15 min, 45°C). Frakcja S i preparat białek denaturowanych *in vitro* różnią się np. gęstością pozorną odpowiadającą  $\rho = 1,26$  g/ml roztworu sacharozy i 1,07 g/ml odpowiednio. Wskazuje to na różną konformację białek w porównywanych frakcjach. Poza tym frakcja S zawiera związane Hsps: DnaJ, DnaK [1] oraz niedawno poznane i badane intensywnie małe białka szoku termicznego (sHsps — *small Heat shock proteins*) IbpA i IbpB [124]. O grupie eukariotycznych sHsps obecnie wiadomo, że uczestniczą w zjawisku termooporności co sugeruje, że odgrywają rolę w ochronie natywnej konformacji białek komórkowych, że w komórce poddanej szokowi termicznemu sHsps wiążą dużą część rozkładających się białek i utrzymują je w stanie kompetencji do renaturacji, która będzie mogła nastąpić po powrocie do fizjologicznych warunków wzrostu.

We frakcji S nie udało się wykryć (metodami immunoblotingu) Hsps GroEL, GroES i GrpE. Mogłoby to być zgodne z przytoczonym modelem Langera rozwiniętym później przez Buchbergera i wsp. [126]. Autorzy ci wykazują, że układy białek opiekuńczych DnaK/DnaJ/GrpE oraz GroEL/GroES współdziałają ze sobą, w odpowiedniej kolejności wielokrotnie wiążąc i uwalniając substraty ulegające fałdowaniu aż do uzyskania przez nie konformacji właściwej aktywnemu białku.

Łącząc omówione fakty można z pewną dozą prawdopodobieństwa zaproponować kolejność wydarzeń w komórce po szoku termicznym. Frakcja zagregowanych białek (frakcja S) powstaje parę minut po podwyższeniu temperatury, jak można przypuszczać, z powodu chwilowego niedoboru Hsps, który w komórkach dzikich zostaje szybko (ok. 10 min) wyrównany w wyniku indukcji regulonów szoku termicznego. Na podstawie literatury, doświadczeń z mutantami *hsp*s i doświadczeń *in vitro* sądzimy, że agregaty są chronione przed zbyt efektywną proteolizą przez związanie białek DnaJ i IbpA/B i utrzymywane w formie nadającej się do renaturacji. W pierwszym etapie usuwania agregatów odgrywa ważną rolę dezagregacja zdenaturowanych białek przez ClpB, uwolnione z agregatów cząsteczki mogą oddziaływać z Hsps: DnaK/DnaJ wiążącymi ich niesfałdowane fragmenty i ułatwiającymi powstawanie struktur drugorzędowych, GrpE przenoszącym tak uformowane substraty na kompleks GroEL/ES, który doprowadza je do kompletnej renaturacji. Z tym procesem konkuruje działanie systemów proteolitycznych cytoplazmatycznych, błonowych

i periplazmatycznych których podjednostki lub domeny posiadające centra aktywne ATPaz rozpoznają zdenaturowane białka i prezentują proteolitycznym centrom aktywnym. Narazie nie ma informacji w jaki sposób rozpoznaje substraty proteaza HtrA, co pozostaje jedną z wielu zagadek do rozwiązania.

Artykuł powstał w trakcie realizacji projektu KBN 386/PO4/97/13.

W poprzednim numerze Postępów Biochemii ukazała się obszerna praca przeglądowa dotycząca białek szoku termicznego „Rodzina genów stresu hsp70 ssaków” autorstwa Pani Dr Lisowskiej i Pana Doc. Krawczyka.

Artykuł otrzymano 9 lipca 1998 r.  
Zaakceptowano do druku 10 sierpnia 1998 r.

## Piśmiennictwo

1. Kucharczyk K, Laskowska E, Taylor A (1991) *Mol Microbiol* 5: 2935-2945
2. Gragerov AI, Martin ES, Krupenko MA, Kashlev MV, Nikiforov VG (1991) *FEBS Lett* 291: 222-224
3. Tetz VV, Rybalchenko OV, Savkova GA (1993) *J Basic Microbiol* 33: 131-139
4. Schröder H, Langer T, Hartl FU, Bukau B (1993) *EMBO J* 12: 4137-4144
5. Bensaude O, Pinto M, Dubois M-F, Trung NV, Morange M (1990) W: Schlesinger MJ, Santoro MG, Garaci E (red) *Stress proteins*. Springer-Verlag, Berlin, str. 89-99
6. Pinto M, Morange M, Bensaude O (1991) *J Biol Chem* 266: 13946-13941
7. Lepock JR, Frey HE, Richie KP (1993) *J Cell Biol* 122: 1267-1276
8. King J, Haase-Pettingell C, Robinson AS, Speed M, Mitraki A (1996) *FASEB J* 10: 57-66
9. Grossman AD, Erickson JW, Gross CA (1984) *Cell* 38: 383-390
10. Erickson JW, Gross CA (1989) *Gen & Dev* 3: 1462-1471
11. Bowden GA, Paredes AM, Georgiu G (1991) *Biotechnology* 9: 725-730
12. Goff SA, Goldberg AL (1985) *Cell* 41: 587-595
13. Ananthan J, Goldberg AL, Voelmy R (1986) *Science* 232: 522-524
14. Georgopoulos C, Welch WJ (1993) *Annu Rev Cell Biol* 9: 601-634
15. Parsell DA, Lindquist S (1993) *Annu Rev Genet* 27: 437-496
16. Wild J, Walter WA, Gross CA, Altman E (1993) *J Bacteriol* 175: 3992-3997
17. Visick JE, Clarke S (1995) *Mol Microbiol* 16: 835-845
18. Ang D, Liberek K, Skowrya D, Żylicz M, Georgopoulos C (1991) *J Biol Chem* 266: 24233-24236
19. Frydman J, Hartl U (1994) W: Morimoto RI, Tissieres A, Georgopoulos C (red) *The biology of heat shock proteins and molecular chaperones*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, str. 251-283
20. Hartl U (1996) *Nature (Lond)* 381: 571-580
21. Kumamoto CA (1991) *Mol. Microbiol* 5: 19-22
22. Georgopoulos C, Liberek K, Żylicz M, Ang D (1994) W: Morimoto RI, Tissieres A, Georgopoulos C (red) *The biology of heat shock proteins and molecular chaperones*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, str. 209-249
23. Gottesman S, Wickner S, Maurizi MR (1997) *Genes and Dev* 11: 815-823
24. Suzuki CK, Rep M, van Dijl JM, Suda K, Grivell LA, Schatz G (1997) *TIBS* 22: 118-123
25. Błaszczak A, Żylicz M, Georgopoulos C, Liberek K (1995) *EMBO J* 14: 5085-5093
26. Liberek K (1995) *Post Biochem* 41: 94-102
27. Langer T, Lu C, Echols H, Flanagan J, Hayer MK,



- Hartl FU (1992) *Nature* (Lond) **356**: 683-689
28. Skowrya D, Georgopoulos C, Zylicz M (1990) *Cell* **62**: 939-944
  29. Ziemienowicz A, Skowrya D, Zeilstra-Ryalls J, Fayet O, Georgopoulos C, Zylicz M (1993) *J Biol Chem* **268**: 25425-25431
  30. Thomas JG, Baneyx F (1996a) *J Biol Chem* **271**: 11141-11147
  31. Thomas JG, Baneyx F (1996b) *Mol Microbiol* **21**: 1185-1196
  32. Gilbert HF (1997) *J Biol Chem* **272**: 29399-29402
  33. Freedman RB, Hirst TR, Tuite MC (1994) *TIBS* **19**: 331-336
  34. deCrouy-Chanel A, Kohiyama M, Richarme G (1995) *J Biol Chem* **270**: 22669-22672
  35. Hottenrott S, Schumann T, Pluckthun A, Fischer G, Rahfeld JU (1997) *J Biol Chem* **272**: 15697-15701
  36. Kandrór O, Sherman M, Rhode M, Goldberg AL (1995) *EMBO J* **14**: 6021-6027
  37. Hesterkamp T, Hauser S, Lütcke H, Bukau B (1996) *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **93**: 4437-4441
  38. Wawrzynów A, Wojtkowiak D, Marszałek J, Banecki B, Jensen M, Graves B, Georgopoulos C, Zylicz M (1995) *EMBO J* **14**: 1867-1877
  39. Wickner S, Gottesman S, Skowrya D, Hoskins J, McKenney K, Maurizi MR (1994) *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 12218-12222
  40. Schmitt M, Neupert W, Langer T (1995) *EMBO J* **14**: 3434-3444
  41. Wagner I, Arlt H, van Dyck L, Langer T, Neupert W (1994) *EMBO J* **13**: 5135-5145
  42. Arlt H, Tauer R, Feldman H, Neupert W, Langer T (1996) *Cell* **85**: 875-885
  43. Straus DB, Walter WA, Gross CA (1988) *Genes Dev* **2**: 1851-1858
  44. Kroh HE, Simon LD (1991) *J Bacteriol* **173**: 2691-2695
  45. Sherman MY, Goldberg AL (1992) *EMBO J* **11**: 71-77
  46. Keller JA, Simon LD (1988) *Mol Microbiol* **2**: 31-41
  47. Maurizi MR (1992) *Experientia* **48**: 178-201
  48. Gottesman S, Maurizi MR (1992) *Microbiol* **56**: 592-621
  49. Gottesman S (1996) *Ann Rev Genet* **30**: 465-506
  50. Charette M, Henderson GW, Markowitz A (1981) *Proc Natl Acad Sci USA* **78**: 4728-4732
  51. Chung CH, Goldberg AL (1981) *Proc Natl Acad Sci USA* **78**: 4931-4935
  52. Chin DT, Goff SA, Webster T, Smith T, Goldberg AL (1988) *J Biol Chem* **263**: 11718-11728
  53. Goldberg AL, Moerschell RP, Chung CH, Maurizi MR (1994) *Methods Enzymol* **244**: 350-375
  54. Van Melderen L, Thi MHD, Lecchi P, Gottesman S, Couturier M, Maurizi MR (1996) *J Biol Chem* **271**: 27730-27738
  55. Hilliard JJ, Maurizi MR, Simon LD (1998) *J Biol Chem* **273**: 518-523
  56. Hilliard JJ, Simon LD, Van Melderen, Maurizi MR (1998) *J Biol Chem* **273**: 524-527
  57. Laskowska E, Kuczyńska-Wisnik D, Skórko-Glonek J, Taylor A (1996) *Mol Microbiol* **22**: 555-572
  58. Goldberg AL (1990) *Semin cell biol* **1**: 423-432
  59. Maurizi MR, Trisler P, Gottesman S (1985) *J Bacteriol* **164**: 1124-1135
  60. Parsell DA, Lindquist S (1994) W: Morimoto RI, Tissieres A, Georgopoulos C (red) The biology of heat shock proteins and molecular chaperones. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, str. 457-494
  61. Gottesman S, Clark WP, de Crecy-Lagard V, Maurizi MR (1993) *J Biol Chem* **268**: 22618-22626
  62. Wojtkowiak D, Georgopoulos C, Zylicz M (1993) *J Biol Chem* **268**: 22609-22617
  63. Kroh HE, Simon LD (1990) *J Bacteriol* **172**: 6026-6034
  64. Maurizi MR, Clark WP, Katayama Y, Rudikoff S, Pumphrey J, Bowers B, Gottesman S (1990) *J Biol Chem* **265**: 12536-12545
  65. Maurizi MR, Thompson MW, Singh KS, Kim S-H (1994) *Methods Enzymol* **244**: 314-331
  66. Thompson MW, Maurizi MR (1994) *J Biol Chem* **269**: 18201-18208
  67. Squires C, Squires CL (1992) *J Bacteriol* **174**: 1081-1085
  68. Gottesman S, Squires C, Pichersky E, Carrington M, Hobbs M, Mattick JS, Dalrymple B, Kuramitsu H, Shiroza T, Foster T, Clark WP, Ross B, Squires CL, Maurizi MR (1990) *Proc Natl Acad Sci USA* **87**: 3513-2517
  69. Kessel M, Maurizi MR, Kim B, Kocsis E, Trus BL, Singh SK, Steven AC (1995) *J Mol Biol* **250**: 587-594
  70. Singh SK, Maurizi MR (1994) *J Biol Chem* **269**: 29537-29545
  71. Peters JM (1994) *TIBS* **19**: 377-382
  72. Tobias JW, Shrader TE, Rocap G, Varshavsky A (1991) *Science* **254**: 1374-1377
  73. Wickner S, Gottesman S, Skowrya D, Hoskins J, McKenney K, Maurizi MR (1994) *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 12218-12222
  74. Pak M, Wickner S (1997) *Proc Natl Acad Sci* **94**: 4901-4906
  75. Grimaud R, Kessel M, Beuron F, Steven AC, Maurizi MR (1998) *J Biol Chem* **273**: 12476-12481
  76. Schweder T, Lee K-H, Lomovskaya O, Martin A (1996) *J Bacteriol* **178**: 470-476
  77. Lehnerr H, Yarmolinsky MB (1995) *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 3274-3277
  78. Georgopoulos C, Liberek K, Zylicz M, Ang D (1994) W: Morimoto RI, Tissieres A, Georgopoulos C (red) The biology of heat shock proteins and molecular chaperones CSHL Press, str. 209-249
  79. Keiler KC, Waller PRH, Sauer RT (1996) *Science* **271**: 990-993
  80. Gottesman S, Roche E, Zhou Y, Sauer RT (1998) *Genes Dev* **12**: 1338-1347
  81. Herman C, Thevenet D, Bouloc P, Walker GC, D'Ari R (1998) *Genes Dev* **12**: 1348-1355
  82. Jentsch S (1996) *Science* **271**: 955-956
  83. Muto A, Ushida C, Himeno H (1998) *Trends Biochem Sci* **23**: 25-29
  84. Mhammedi-Alaoui A, Pato M, Gamma MJ, Toussaint A (1994) *Mol Microbiol* **11**: 1109-1116
  85. Levchenko I, Luo L, Baker TA (1995) *Genes & Dev* **9**: 2399-2408
  86. Levchenko I, Yamauchi M, Baker TA (1997) *Genes Dev* **11**: 1561-1572
  87. Squires CL, Pedersen S, Ross BM, Squires C (1991) *J Bacteriol* **173**: 4254-4262
  88. Kitagawa M, Wada C, Yochioka S, Yura T (1991) *J Bacteriol* **173**: 4247-4253
  89. Woo KM, Kim KI, Godberg AL, Ha DB, Chung CH (1992) *J Biol Chem* **267**: 20429-20434
  90. Park SK, Kim K, Woo KM, Seol JK, Tanaka K, Ichihara A, Ha DB, Chung CH (1993) *J Biol Chem* **268**: 20170-20174
  91. Leonhardt SA, Fearson K, Danese PN, Mason TL (1993) *Mol Cell Biol* **13**: 6304-6313
  92. Schirmer EC, Glover JR, Singer MA, Lindquist S (1996) *Trends Biochem Sci* **21**: 289-296
  93. Chuang S-E, Burland V, Plunket III G, Daniels DL, Blattner FR (1993) *Gene* **134**: 1-6
  94. Yoo SJ, Seol JH, Shin DH, Rohrwild M, Kang MS, Tanaka K, Goldberg AL, Chung CA (1996) *J Biol Chem* **271**: 14035-14040
  95. Rohrwild M, Coux O, Huang HC, Moerschell RP, Yoo SJ, Seol JH, Chung CH, Goldberg AL (1996) *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 5808-5813
  96. Kanemori M, Nishihara K, Yanagi H, Yura T (1997) *J Bacteriol* **179**: 7219-7225
  97. Missiakas D, Schwager F, Betton J-M, Georgopoulos C, Raina S (1996) *EMBO J* **15**: 6899-6909
  98. Bagyo M, McMaster JS, Gaczynska M, Tortorella D, Goldberg AL, Ploegh H (1997) *Proc Natl Acad Sci* **94**: 6629-6634
  99. Kessel M, Wu W, Gottesman S, Kocsis E, Stewen AC, Maurizi AR (1996) *FEBS Lett* **398**: 274-278
  100. Skórko-Glonek J, Krzewski K, Lipińska B, Bertoli E, Tanfani F (1995) *J Biol Chem* **270**: 11140-11146
  101. Goldberg AL, Sreedhara Swamy KH, Chung

- CH, Larimore FS (1981) *Methods Enzymol* **80**: 680-702
102. Lipińska B, Sharma S, Georgopoulos C (1988) *Nucl Acids Res* **16**: 10053-10067
103. Lipińska B, Fayet O, Baird L, Georgopoulos C (1989) *J Bacteriol* **171**: 1574-1584
104. Lipińska B, Zylicz M, Georgopoulos C (1990) *J Bacteriol* **172**: 1791-1797
105. Strauch KL, Johnson K, Beckwith J (1989) *J Bacteriol* **171**: 2689-2696
106. Seol JH, Woo SK, Jung EM, Yoo SJ, Lee CS, Kim K, Tanaka K, Ichihara K, Ha DB, Chung CH (1991) *Biochem Biophys Res Commun* **176**: 730-736
107. Skórko-Glonek J, Lipińska B, Krzewski K, Zolse G, Bertoli E, Tanfani F (1997) *J Biol Chem* **272**: 8974-8982
108. Meccas J, Rouviere OP, Erickson JW, Donohue TJ, Gross CA (1993) *Genes Dev* **7**: 2618-2628
109. Wülfing C, Plückthun A (1994) *Mol Microbiol* **12**: 685-692
110. Buchner J (1996) *FASEB J* **10**: 10-19
111. Danese PN, Snyder WB, Cosma CL, Davis JB, Silhavy TJ (1995) *Genes & Dev* **9**: 387-398
112. Lazar SW, Kolter R (1996) *J Bacteriol* **178**: 1770-1773
113. Cavard D (1995) *FEMS Microbiol Lett* **125**: 173-178
114. Strauch KL, Beckwith J (1988) *Proc Natl Acad Sci* **85**: 1576-1580
115. Artl H, Tauer R, Feldmann H, Neupert W, Langer T (1996) *Cell* **85**: 875-885
116. Tomoyasu T, Gamer J, Bukau B, Kanemori M, Mori H, Rutman AJ, Oppenheim AB, Yura T, Yamanaka K, Niki H, Hiraga S, Ogura T (1995) *EMBO J* **14**: 2551-2560
117. Leffers CG, Gottesman S (1998) *J Bacteriol* **180**: 1573-1577
118. Shotland Y, Koby S, Teff D, Mansur N, Oren DA, Tatematsu K, Tomoyasu T, Kessel M, Bukau B, Ogura T, Oppenheim AB (1997) *Mol Microbiol* **24**: 1303-1310
119. Kihara A, Akiyama Y, Ito K (1997) *Proc Natl Acad Sci USA* **94**: 5544-5549
120. Kihara A, Akiyama Y, Ito K (1996) *EMBO J* **15**: 6122-6131
121. Herman C, Thevenet D, D'Ari R, Bouloc P (1997) *J Bacteriol* **179**: 358-363
122. Wang RF, O'Hara EB, Aldea M, Bargmann CI, Gromley H, Kushner SR (1998) *J Bacteriol* **180**: 1929-1938
123. Levitt M, Gerstein M, Huang E, Subbiah S, Tsai J (1997) *Ann Rev Biochem* **66**: 549-579
124. Laskowska E, Wawrzynów A, Taylor A (1996) *Biochimie* **78**: 117-122
125. Ehrnsperger M, Gräber S, Gaestel M, Buchner J (1997) *EMBO J* **16**: 221-229
126. Buchberger A, Schröder H, Hesterkamp T, Schönfeld HJ, Bukau B (1996) *J Mol Biol* **261**: 328-333

## 7th Symposium of the European Society for the Study of Purine & Pyrimidine Metabolism in Man

Gdańsk (Poland)  
14—18 September, 1999

---

### Organized for ESSPPMM

by the Faculty of Biotechnology University of Gdańsk & Medical University of Gdańsk and the Gdańsk Branch of the Polish Biochemical Society.

**Chairman of the Organizing Committee: Prof. Dr Wiesław Makarewicz**

The principal aim of the Symposium is to provide forum for interdisciplinary presentation of current research in both basic and clinical aspects of purine metabolism in man. Every effort will be made to ensure a good blend of interests, with metabolism, enzymology, biochemical pathology, receptor signalling & regulation, molecular biology and clinical and therapeutic aspects receiving similar coverage.

---

#### Information and inquiries: PP'99

Dr. A.C. Składanowski  
Department of Biochemistry  
Medical University of Gdańsk  
ul. Dębinki 1, 80-211 Gdańsk, Poland  
Tel/fax: (+48 58) 3021386  
e-mail: pp99@amedec.amg.gda.pl.

See also at the Internet page: <http://www.amg.gda.pl/~pp99>

# Białko IHF jako regulator metabolizmu *Escherichia coli*

## IHF as a regulator of metabolism in *Escherichia coli*

AGNIESZKA SIRKO\*

### Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Geny kodujące IHF
  - II-1. Regulacja ekspresji *ihfA* i *ihfB* u *E. coli*
  - II-2. Geny kodujące IHF u innych bakterii
- III. Białko IHF
  - III-1. Budowa białka
  - III-2. Ilość białka w komórkach a liczba jego miejsc wiązania w genomie *E. coli*
- IV. Wiązanie IHF z DNA
  - IV-1. Sekwencja DNA odpowiedzialna za wiązanie białka IHF
  - IV-2. Zdolność do zginania DNA
  - IV-3. Struktura krystaliczna IHF-DNA
  - IV-4. Mutanty w podjednostkach kodujących IHF, dimeryzacja a zdolność do wiązania się z DNA. Czy homodimery są aktywne?
- V. Fenotypy mutantów *ihf*
- VI. Rola białka IHF w metabolizmie komórki bakterii gramujemnych
  - VI-1. Plazmidy
    - VI-1.1. Koniugacyjny transfer plazmidów
    - VI-1.2. Replikacja plazmidów
  - VI-2. Bakteriofagi
    - VI-2.1. Mu
    - VI-2.2. Lambda
    - VI-2.3. Inne bakteriofagi
  - VI-3. Transpozycja i inwersja
  - VI-4. Replikacja chromosomalnego DNA
  - VI-5. Regulacja ekspresji genów
  - VI-6. IHF a stacjonarna faza hodowli bakteryjnych
- VII. HU — białko podobne do IHF
- VIII. Białka podobne do IHF w systemach eukariotycznych
- IX. Uwagi końcowe

### Contents:

- I. Introduction
- II. Genes encoding IHF
  - II-1. Regulation of *ihfA* and *ihfB* expression in *E. coli*
  - II-2. IHF encoding genes in other bacteria
- III. IHF protein
  - III-1. Protein structure
  - III-2. IHF levels in cells and the amount of IHF binding sites in *E. coli* genome
- IV. DNA binding by IHF
  - IV-1. Consensus sequence for IHF
  - IV-2. DNA-binding ability
  - IV-3. Crystal structure of IHF-DNA complex
  - IV-4. Mutants in genes encoding IHF subunits, dimerization and DNA-binding. Are homodimers active?
- V. Phenotypes of *ihf* mutants
- VI. The role of IHF in metabolism of Gram negative bacteria
  - VI-1. Plasmids
    - VI-1.1. Conjugative transfer of plasmids
    - VI-1.2. Plasmids replication
  - VI-2. Bacteriophages
    - VI-2.1. Mu
    - VI-2.2. Lambda
    - VI-2.3. Other bacteriophages
  - VI-3. DNA transposition and inversion
  - VI-4. Replication of chromosomal DNA
  - VI-5. Gene expression regulation
  - VI-6. IHF and the stationary phase of growth
- VII. HU as an IHF homologue
- VIII. IHF homologues in eukaryotic systems
- IX. Concluding remarks

**Wykaz stosowanych skrótów:** HU — prokariotyczne białko spokrewnione z IHF należące do grupy białek histono-podobnych; ppGpp — czterofosforan guanozyny; RIP — palindromowe sekwencje DNA, do których wiąże się IHF;  $\sigma^{38}/\sigma^S/RpoS$  — podjednostka sigma polimerazy RNA charakterystyczna dla fazy stacjonarnej.

### I. Wstęp

Białko IHF (skrót od ang. *integration host factor*) należy do rodziny białek histono-podobnych. Rodzina ta łączy szereg nie spokrewnionych ze sobą białek prokariotycznych o niewielkiej masie cząsteczkowej. Białka te wiążą się do DNA i wywołują jego silną deformację (zgięcie). Najbardziej znane białka należące do tej grupy zestawione zostały w tabeli 1. Białka

histono-podobne biorą udział we wszystkich procesach komórkowych, w których uczestniczy bezpośrednio DNA. Umożliwiają one przyjęcie przez DNA odpowiedniej struktury przestrzennej. Białka histono-podobne bywają czasem określane terminem białka opiekuńcze dla DNA (ang. DNA chaperons) [1]. W ostatnich latach pojawiła się olbrzymia liczba publikacji dotyczących udziału IHF i innych białek histono-podobnych w replikacji, rekombinacji, transpozycji, transkrypcji itd. Świadczy to o powszechnym udziale białek tego typu w prawidłowej regulacji metabolizmu komórki.

Białko IHF, zostało zidentyfikowane początkowo jako bakteryjny czynnik niezbędny do wbudowania DNA bakteriofaga lambda do genomu gospodarza (stąd angielska nazwa białka IHF — integration host factor) [2]. Obecnie powszechnie traktowane jest ono jako ogólny (ale jeden z wielu!) regulator tych wszyst-

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

**Tabela 1.**Białka histono-podobne u *Escherichia coli*

Białko	Forma aktywna	Gen(y)/ /lokalizacja	Długość białka	Masa	pI	Ilość białka w komórce	Specyficzność wiązania
IHF	heterodimer (homodimery)	<i>ihfA</i> /38 min <i>ihfB</i> /20 min	99 aa 94 aa	11.4 kDa 10.7 kDa	10.14 10.17	8.500—17.000 dimerów w fazie logarytmicznej, 5—10 razy więcej w fazie stacjonarnej	tak
HU	heterodimer hemodimery	<i>hupA</i> /90 min <i>hupB</i> /10 min	90 aa 90 aa	9.5 kDa 9.2 kDa	10.36 10.48	30000 dimerów	nie, ale rozpoznaje pewne struktury DNA
H-NS	homodimer	<i>hns</i> /27 min	136 aa	15.4 kDa	5.25	20000 dimerów	tak, ale wiąże się też niespecyficznie
StpA	?	<i>stpA</i> /60 min	134 aa	15.3 kDa	9.08	niewielka	homolog H-NS, ale o dużej specyficzności do RNA
FIS	homodimer	<i>fis</i> /72 min	98 aa	11.2 kDa	10.19	100 w fazie stacjonarnej 50000 w fazie eksponencjonalnej	tak
Lrp	homodimer	<i>lrp</i> /20 min	164 aa	18.8 kDa	9.24	3000 w pożywce minimalnej	tak

kich procesów komórkowych, w przebiegu których istotną rolę odgrywa precyzyjnie ukształtowana struktura DNA.

W niniejszej pracy omówione zostaną następujące problemy: regulacja ekspresji genów kodujących podjednostki IHF, sposób wiązania białka do DNA oraz wpływ IHF na procesy komórkowe. Wszystkie omawiane poniżej prace, z wyjątkiem podrozdziałów wyraźnie zaznaczonych, dotyczą komórek *Escherichia coli*.

## II. Geny kodujące IHF

Niedawno zaproponowano ujednoczenie nomenklatury genów kodujących obie podjednostki białka IHF [3]. Nowa nomenklatura dla tych genów: *ihfA* (poprzednio *himA*) oraz *ihfB* (poprzednio *himD* lub *hip*) będzie konsekwentnie stosowana w niniejszej pracy.

### II-1. Regulacja ekspresji *ihfA* i *ihfB* u *E. coli*

Geny *ihf* są zlokalizowane w różnych miejscach chromosomu *E. coli* (Tab. 1). Gen *ihfA* jest ulokowany bezpośrednio za grupą genów (*thrS infC rplT pheS pheT*) kodujących białka związane z translacją. Ekspresja tych genów jest wyjątkowa złożona i zależna od warunków wzrostu bakterii. Wykazano, że *ihfA* może ulegać ekspresji zarówno z promotora, z którego inicjowany jest policistronowy transkrypt zawierający także geny *pheS* i *pheT* kodujące dwie podjednostki syntetazy fenylo-alanylo-tRNA jak i z promotora specyficznego dla *ihfA* i zlokalizowanego wewnątrz genu *pheT* [4, 5]. Według niektórych autorów gen *ihfA* może ulegać wspólnej transkrypcji nawet z genami poprzedzającymi geny *pheS* i *pheT* [6]. Gen *ihfB* zlokalizowany jest bezpośrednio za genem *rpsA* kodującym rybosomalne białko S1 [7]. Podobnie jak

w przypadku *ihfA*, kilka promotorów jest zaangażowanych w ekspresję genu *ihfB* [8].

W fazie wzrostu logarytmicznego hodowli sekwencje odpowiadające *ihfA* i *ihfB* są obecne głównie na transkryptach policistronowych, zawierających oprócz transkryptów *ihf* także sekwencje odpowiadające genom ulokowanym bezpośrednio przed nimi. W warunkach hodowli stacjonarnej geny *ihf* ulegają transkrypcji głównie z własnych, specyficznych promotorów. Z promotorów tych inicjowane są krótkie transkrypty monocistronowe (nie opublikowane obserwacje własne oraz [4, 5, 8]). Aktywność promotorów, z których inicjowane są transkrypty policistronowe nie będzie w tej pracy omawiana. Wyniki dyskutowane poniżej dotyczą jedynie transkrypcji inicjowanej z promotorów specyficznych dla genów *ihf*, które określane bywają czasem w literaturze jako P<sub>4</sub> (*ihfA*) i P<sub>5</sub> (*ihfB*). Miejsca startu transkrypcji dla obu promotorów zostały zlokalizowane [9]. Użycie fuzji transkrypcyjnych z genomem reporterowym *lacZ* oraz bezpośrednio pomiary ilości RNA wykazały, że aktywność obu promotorów wzrasta kilkakrotnie w fazie stacjonarnej [9, 10]. Wzrost transkrypcji obu genów zależny jest od czterofosforanu guanozyny (ppGpp) oraz podjednostki  $\sigma^S$  polimerazy RNA specyficznej dla fazy stacjonarnej (znanej także pod nazwą  $\sigma^{38}$  lub RpoS) [9]. Stosując wspomniane powyżej techniki wykazano autoregulację genów *ihf* [9, 10]. Transkrypcja inicjowana z promotorów P<sub>4</sub> (*ihfA*) i P<sub>5</sub> (*ihfB*) jest negatywnie regulowana przez białko IHF. Warto podkreślić, iż z badań z użyciem fuzji *ihf-lacZ* wynika, że gen *ihfB* jest mniej wrażliwy na autoregulację przez IHF aniżeli gen *ihfA*. W nieobecności funkcjonalnego białka IHF transkrypcja *ihfB* wzrasta zaledwie dwukrotnie, natomiast transkrypcja genu *ihfA* co najmniej czterokrotnie [10]. W regionach regulatorowych obu promotora

rów zlokalizowano miejsca wiązania białka IHF [9, 10]. Wiązanie IHF w regionie promotora P<sub>5</sub> (*ihfB*) wywołuje bardzo silne zmiany konformacji DNA. Promotor ten zawiera 6 miejsc specyficznie wiążących białko IHF [10]. W regionie promotora P<sub>4</sub> (*ihfA*) zlokalizowano jednosilne oraz dwa nieco słabsze miejsca wiązania IHF [10].

## II-2. Geny kodujące IHF u innych bakterii

Geny kodujące IHF zostały zidentyfikowane u następujących bakterii gramujemnych: *Salmonella typhimurium*, *Erwinia chrysanthemi*, *Haemophilus influenzae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas putida*, *Pasteurella haemolytica*, *Rhodobacter capsulatus* oraz *Serratia marcescens* (dane z bazy danych EMBL, Release 54.0). Białko IHF nie występuje natomiast u bakterii gramododatnich. Na krótkie omówienie zasługuje strategia klonowania genów kodujących IHF z różnych bakterii [11, 12]. Metoda ta opiera się na obserwacji, że bakteriofag lambda nie namnaża się w szczepach *E. coli* z nieaktywnymi białkami HU (podwójne mutanty *hupA* i *hupB*) oraz IHF. Szczep z potrójną mutacją *hupA hupB ihfA* stosowany był do klonowania genów *ihfA*, zaś szczep z potrójną mutacją *hupA hupB ihfB* stosowano do klonowania genów *ihfB*. Poszukiwano klonów z bibliotek (skonstruowanych na wektorach pochodzących z faga lambda) genomowego DNA poszczególnych gatunków bakterii, które były w stanie namnażać się na użytych szczepach *E. coli*. Sekwencja DNA zidentyfikowanych w ten sposób genów kodujących podjednostki IHF była następnie określana oraz porównywana z sekwencją genów *ihfE. coli* [11, 12]. Pomimo braku danych dotyczących sekwencji genów *ihf* u innych, niż wymienione powyżej, bakterii gramujemnych obecność IHF u wielu innych bakterii z tej grupy jest dobrze udokumentowana. Wiadomo np. że białko to pozytywnie reguluje geny wirulencji u *Shigella flexneri* [13] oraz jest koaktywatorem transkrypcji *pilE* u *Neisseria gonorrhoeae* [14]. Ponadto, białko IHF zostało wyizolowane z komórek *Acinetobacter junii* oraz *Proteus vulgaris* [15].

## III. Białko IHF

### III-1. Budowa białka

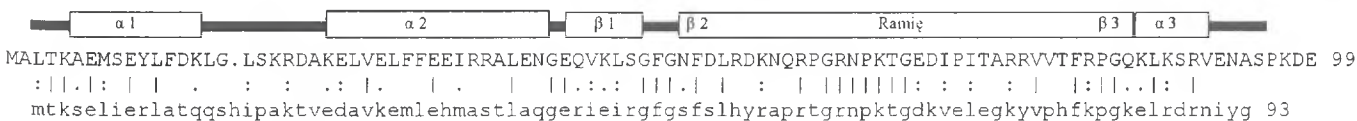
Białko IHF jest białkiem heterodimerskim, składającym się z podjednostek IhfA ( $\alpha$ ) o masie cząsteczkowej 11350 oraz IhfB ( $\beta$ ) o masie cząsteczkowej

10650. Podjednostki wykazują jedynie ok. 30% identycznych aminokwasów natomiast ich struktura drugorzędowa jest bardzo zbliżona (Ryc. 1). Istnieją dane wskazujące na możliwość tworzenia homodimerów  $\alpha\alpha$  i  $\beta\beta$  oraz ich oddziaływania z DNA. Prace te zostaną omówione w rozdziale IV.4.

### III-2. Ilość białka IHF w komórkach a liczba jego miejsc wiązania w genomie *E. coli*

Komórki bakteryjne w fazie wzrostu logarytmicznego zawierają 8500-17000 dimerów IHF, co przy założeniu, że objętość komórki wynosi 2  $\mu\text{m}^3$ , odpowiada stężeniu 7-14  $\mu\text{M}$  (0.5 do 1 ng IHF na  $\mu\text{g}$  wszystkich białek komórkowych) [16]. Ilość białka IHF wzrasta 5- do 10-krotnie w warunkach hodowli stacjonarnej [16], osiągając wartość 5-6 ng/ $\mu\text{g}$  całkowitego białka obecnego w komórce. Liczba heterodimerów IHF w komórce jest porównywalna z liczbą rybosomów oraz ilością białka HU natomiast znacznie przekracza ilości innych białek wiążących się specyficznie do DNA [17]. Poziom obu podjednostek zmienia się w sposób skoordynowany [16, 18].

Do określenia liczby miejsc wiążących IHF w genomie *E. coli* zastosowano interesującą technikę badawczą [19, 20]. Metoda ta polega na dwukierunkowym rozdziale elektroforetycznym DNA genomowego, podzielonego uprzednio na niewielkie fragmenty i inkubowanego z białkiem IHF. W pierwszym kierunku kompleksy białko-DNA rozdzielane są w niskiej temperaturze. Elektroforeza w drugim kierunku przeprowadzana jest w wysokiej temperaturze (60°C) powodującej rozbitcie kompleksów. Porównanie wzoru takiej elektroforezy ze wzorem elektroforezy uzyskanej bez badanego białka (w tym wypadku IHF) pozwala na określenie liczby fragmentów DNA wiążących dane białko. Przy użyciu powyżej opisanej techniki określono, że jest około 70 specyficznych miejsc w chromosomie *E. coli*, do których z dużym powinowactwem wiąże się IHF [19, 20]. Inni badacze ustalili, że w chromosomie *E. coli* jest ok. 100 kopii tzw. sekwencji RIP (zwanymi również RIB) tj. palindromowych sekwencji wiążących IHF. Sekwencje te zlokalizowane są zawsze w regionach ulegających transkrypcji ale nie ulegających translacji [21, 22]. Lokalizacja sekwencji RIP sugeruje, że mogą one wpływać na stabilizację transkryptów. Sugerowano również, że sekwencje te mogą mieć znaczenie w utrzymaniu odpowiedniej struktury DNA [22]. Wspomniane powyżej sekwencje, to prawdopodobnie miejsca, do których IHF



Ryc. 1. Struktura pierwszo- i drugorzędowa podjednostek IHF.

Powyżej sekwencji aminokwasowej obu białek zaznaczono schematycznie poszczególne domeny: trzy struktury typu alfa-helisy ( $\alpha 1$ - $\alpha 3$ ) oraz trzy struktury typu beta-kartki ( $\beta 1$ - $\beta 3$ ). Pomiędzy strukturami  $\beta 2$  i  $\beta 3$  znajduje się tzw. ramię posiadające również strukturę beta-kartki.

posiada największe powinowactwo. Ditto i wsp. [16] sugerują, że faktyczna liczba miejsc, do których wiąże się IHF (prawdopodobnie z mniejszym powinowactwem) jest w rzeczywistości dużo wyższa. Uważają również, że większość białka IHF obecnego w komórce pozostaje w formie związanej z DNA, głównie w miejscach, do których białko to posiada stosunkowo niskie powinowactwo. Hipotezę tę wspierają doświadczenia przeprowadzone przez innych badaczy [23], którzy sprawdzali stan wysycenia kilku wybranych miejsc wiązania IHF w warunkach *in vivo*. Z doświadczeń tych wynika, że w warunkach wzrostu logarytmicznego niektóre miejsca nie są w pełni zajęte przez IHF, natomiast w fazie stacjonarnej, gdy ilość białka IHF wzrasta 5-10-krotnie, miejsca te są wysyczone przez IHF.

#### IV. Wiązanie IHF z DNA

##### IV-1. Sekwencja DNA odpowiedzialna za wiązanie białka IHF

Mechanizm oddziaływania IHF z DNA był intensywnie badany. Jedna cząsteczka białka wiąże się w małym rowku DNA [24], rozpoznając sekwencję najwyższej zgodności zwaną sekwencją kanoniczną (ang. consensus). Kilka sekwencji kanonicznych dla białka IHF zaproponowanych przez różnych autorów zostało zestawionych w tabeli 2. Ścisła konserwacja nukleotydów w sekwencji kanonicznej dla IHF dotyczy tylko ich bardzo niewielkiej liczby (Tab. 2), jednakże fakt specyficzności wiązania IHF do określonych sekwencji DNA jest niepodważalny. Białko to wiąże się  $10^3$ - $10^4$  razy bardziej wydajnie do takich miejsc w DNA niż do miejsc przypadkowych [26-28].

##### IV-2. Zdolność do zginania DNA

Mechanizm oddziaływania IHF z DNA był stosunkowo dobrze poznany jeszcze przed ustaleniem struktury krystalicznej. Jedną z najważniejszych cech białka IHF jest jego zdolność do zginania DNA. Stwierdzono, że jedna cząsteczka białka IHF wiąże się na obszarze co najmniej 25 par nukleotydów DNA, co przy niewielkich rozmiarach białka sugerowało, że cząsteczka DNA jest zgięta dookoła dimeru białka IHF [24]. Fakt zginania DNA przez białko IHF był potwierdzony za pomocą kilku technik badawczych: badania opóźnienia migracji fragmentu DNA podczas elektroforezy w żelu [29], cyklizacji przez IHF fragmentu DNA zawierającego odpowiednio ułożone miejsca wiązania IHF [30] oraz identyfikacji metodami foto-chemicznymi miejsc kontaktu pomiędzy IHF a DNA [31]. Za pomocą doświadczeń genetycznych ustalono, które aminokwasy obu podjednostek są niezbędne do rozpoznania poszczególnych nukleotydów w sekwencji kanonicznej [18, 32, 33] oraz zaproponowano precyzyjny model wiązania się IHF

**Tabela 2.**

Proponowane sekwencje najwyższej zgodności w DNA dla białka IHF

Sekwencja w DNA	Referencja
T N P y A A N N N P u T T G a T*	[97]
Y A A N N N N T T G A T W	[25]
Y A A N N W N Y T G W <sub>4</sub> N <sub>7</sub> W <sub>6</sub>	[66]
tntan <sub>6</sub> TAAcTtnTTGATTttaatnaantn <sub>6</sub> a** a t c t a a a t g a	[98]

Objaśnienia symboli: N — dowolny nukleotyd, Py — pirymidyna, Pu — puryna, Y — T lub C, W — A lub T

\* — nukleotydy oznaczone dużymi literami były konserwowane we wszystkich pięciu porównywanych w cytowanej pracy [97] sekwencjach, nukleotydy oznaczone małą literą był konserwowany tylko w czterech sekwencjach.

\*\* — nukleotydy oznaczone dużymi literami są silnie konserwowane (występują częściej niż w 63% porównywanych miejsc wiązania IHF), nukleotydy oznaczone małymi literami są słabo konserwowane (występują w 44-63% porównywanych sekwencji). Zdarza się, że dwa nukleotydy w określonej pozycji spełniają powyższe kryteria — wtedy pokazane są oba.

do DNA [31, 34].

##### IV-3. Struktura krystaliczna IHF-DNA

Ustalenie struktury krystalicznej kompleksu białka IHF z dwuniciowym fragmentem DNA o długości 35 par zasad, zawierającym jedno z najlepiej scharakteryzowanych i najsilniejszych miejsc wiązania IHF, pozwoliło na precyzyjne określenie oddziaływania IHF-DNA [35]. Uzyskanie bardzo silnego (o ponad 160°) zgięcia cząsteczki DNA możliwe jest dzięki dwojakiego rodzaju oddziaływaniu białka IHF na strukturę DNA. Po pierwsze, pozytywny ładunek powierzchni rdzenia dimeru białka, znajdującego się wewnątrz zgięcia DNA, zubożeni negatywny ładunek grup fosforanowych helisy DNA pozwalając na zawężenie rowków w DNA od strony białka i deformację helisy DNA. Po drugie, hydrofobowe ramiona „wciskające się” w mały rowek na zewnątrz miejsca zgięcia stabilizują rozszerzenie małego rowka na zewnątrz kompleksu i odgięcie DNA w stronę rdzenia białka. Struktura kompleksu, która została ustalona w laboratorium H. Nash'a [35] i udostępniona w bazie danych PDB [36], pokazana jest na rycinie 2.

##### IV-4. Mutanty w podjednostkach kodujących IHF, dimeryzacja a zdolność do wiązania się z DNA. Czy homodimery IHF są aktywne?

Podjednostki IHF nie są równocenne w ich sposobie wiązania się do DNA. Szereg mutantów w każdej z podjednostek zostało wyizolowanych oraz scharakteryzowanych pod względem możliwości tworzenia dimerów, asocjacji z DNA, a także funkcjonowania *in vivo* [18, 26, 33]. Za dimeryzację podjednostek od-

powiedzialna jest N-końcowa część białek. Ramię jednej z podjednostek ( $\alpha$ ) rozpoznaje dłuższą część sekwencji kanonicznej, a boczna część drugiej podjednostki ( $\beta$ ) wiąże się z drugą (krótszą) częścią konserwowanej sekwencji kanonicznej [34, 35].

Delecja jednego z genów *ihf* powoduje obniżenie ilości drugiej niezmutowanej podjednostki. Sugeruje to, że tworzenie heterodimerów stabilizuje podjednostki *in vivo* [18, 37]. Homodimery  $\alpha\alpha$  i  $\beta\beta$  są w stanie rozpoznawać specyficznie te same miejsca, do których specyficznie wiąże się heterodimer IHF [38, 39]. Stabilność kompleksów tworzonych przez wiązanie homodimerów do DNA jest jednak wielokrotnie niższa niż stabilność kompleksów IHF z DNA. Wynika to raczej z faktu niestabilności homodimerów, a nie z faktu ich ograniczonej zdolności do wiązania DNA.

W sposób pośredni wykazano niedawno, że homodimery  $\beta\beta$  są wystarczające do zapewnienia wzrostu bakteriofaga T4 [40] oraz właściwej kontroli liczby kopii plazmidu p15A *in vivo* [41].

## V. Fenotypy mutantów *ihf*

Białko IHF nie jest niezbędne do wzrostu bakterii w warunkach laboratoryjnych. W optymalnej temperaturze (37°C) oraz w bogatej pożywce mutanty *ihf* rosną równie dobrze co szczep niezmutowany. Problemy wzrostowe zaczynają się pojawiać u mutantów *ihf* podczas wzrostu w niższej lub wyższej niż optymalna temperaturach (np. 20°C lub 42°C). Wzrost na pożywkach minimalnych zawierających „nieoptymalne” lub obecne w limitujących ilościach źródło węgla, siarki itp. również manifestuje się zaburzeniami wzrostu (obserwacje własne oraz [42]).

Do potwierdzenia obecności mutacji *ihf* użyteczne mogą być inne, łatwiejsze do obserwacji cechy mutantów. Jedną z nich jest niezdolność do utrzymywania plazmidów posiadających miejsce inicjacji replikacji



Ryc. 2. Struktura krystaliczna IHF z DNA wg Rice i wsp. [35]. Jedna z podjednostek IHF została zaznaczona ciemniejszym kolorem.

z plazmidu pSC101 [43]. Kolejną cechą jest obserwacja, że bakteriofag Mu nie może namnażać się (tworzyć lysinek) w mutantach *ihf* [2]. Wiadomo ponadto, że mutanty *ihf* nie rosną bez izoleucyny i waliny w obecności egzogennie dodanej leucyny [44].

## VI. Rola białka IHF w metabolizmie komórki bakterii gramujemnych

### VI-1. Plazmidy

#### VI-1.1. Koniugacyjny transfer plazmidów

Wykazano, że IHF jest potrzebny do transferu plazmidów koniugacyjnych R100 i F [45-47]. IHF wiąże się w regionie inicjacji replikacji koniugacyjnej (*oriT*) tych plazmidów [45, 48, 49]. W mutantach *ihf* występuje również zredukowana ilość transkryptów genów *tra*, których produkty potrzebne są do transferu pomiędzy bakteriami DNA plazmidowego [45]. Ponadto, na przykładzie plazmidu F wykazano, że IHF stymuluje przeprowadzenie przez plazmidową helikazę specyficznego przecięcia jednej nici DNA w obrębie *oriT* [50]. Przecięcie to jest niezbędne do zainicjowania transferu DNA plazmidowego.

#### VI-1.2. Replikacja plazmidów

Wiązanie IHF w regionie miejsca inicjacji replikacji jest udokumentowane dla kilku plazmidów m.in. pSC101 [51], R6K [52] oraz p15A [53]. Plazmid pSC101 jest gubiony po wprowadzeniu do szczepu mutacji *ihf* [43]. Efekt ten wydaje się być w dużym stopniu związany ze stanem superskręcenia plazmidowego DNA [54, 55]. Funkcjonowanie jednego z trzech obecnych na plazmidzie R6K miejsc inicjacji replikacji (*ori gamma*) jest całkowicie zależne od IHF. Plazmidy R6K z delecją dwóch pozostałych miejsc inicjacji replikacji nie replikują się w mutantach *ihf* [52]. W mutantach *ihf* występuje zwiększona liczba kopii plazmidu p15A [41]. Różnica w ilości kopii tego plazmidu pomiędzy szczepem dzikim a mutantami *ihf* jest szczególnie widoczna w fazie stacjonarnej tj. wtedy kiedy w komórce wzrasta ilość białka IHF.

Ponadto, IHF jest potrzebny do właściwego rozdzielenia do komórek potomnych plazmidów/profagów bakteriofaga P1 [56] oraz P7 [57].

### VI-2. Bakteriofagi

#### VI-2.1. Mu

IHF jest niezbędny do wzrostu litycznego bakteriofaga Mu. Efekt ten jest skutkiem aktywowania przez IHF transkrypcji z fagowego promotora  $P_c$  [58]. Wiązanie IHF w tym regionie aktywuje transkrypcję

zarówno pośrednio, poprzez zniesienie „wyciszającego” efektu białka H-NS [59], jak i bezpośrednio, zmieniając konformację DNA i ułatwiając polimerazie RNA związaną się w regionie promotora [60].

### VI-2.2. Lambda

Bakteriofag lambda może przechodzić zarówno cykl lityczny jak i lizogeniczny. Każdy z tych cykli związany jest z precyzyjną regulacją ekspresji odpowiednich genów fagowych, w której uczestniczą zarówno białka pochodzenia fagowego jak i czynniki bakteryjne. Białko IHF jest potrzebne do integracji oraz wycięcia profaga z chromosomu bakteryjnego [61], do pakowania DNA w główki fagowe [62] oraz regulacji ekspresji pewnych genów fagowych. Wcześniej podczas infekcji komórki bakteryjnej fagiem lambda, IHF stymuluje translację fagowego białka cII [63, 64], aktywuje transkrypcję z promotoru  $P_L$  [65] oraz negatywnie reguluje transkrypcję z promotoru  $pR'$  [66]. Udział IHF w regulacji ekspresji genów fagowych prowadzi zatem raczej do wspomagania cyklu lizogenicznego i utrzymania stanu lizogenii w komórce. Miejsce *att* bakteriofaga lambda odpowiedzialne za integrację profaga do genomu *E. coli* jest jednym z najlepiej poznanych przykładów sekwencji DNA zawierających silne miejsca wiązania IHF. Sposób wiązania i deformacji DNA przez IHF był w tym systemie badany bardzo dokładnie [67]. IHF oraz inne białka wprowadzają w tym regionie trzy silne zgięcia DNA ułatwiające związaną integrację fagową.

### VI-2.3. Inne bakteriofagi

IHF jest potrzebny do rozwoju innych bakteriofagów m.in T4 [40], HK022 [68] oraz filamentującego faga  $\phi$  [69]. Pakowanie wirusowego DNA faga P1 do otoczek fagowych wymaga udziału białka IHF [70]. Ponadto, IHF wiąże się do miejsca *att* lambdoidalnych bakteriofagów  $\phi 80$  oraz P22 [25] i jest niezbędny do rozwoju tych fagów [71].

### VI-3. Transpozycja i inwersja

IHF wiąże się do elementów insercyjnych: IS1 [72], IS10 [73], IS50 [74] oraz jest potrzebny do transpozycji dużych elementów transpozycyjnych: Tn10 [73], Tn5 [74] oraz transpozonu gamma delta [75]. Bardzo dobrze udokumentowany jest jego udział w inicjacji cyklu litycznego oraz transpozycji bakteriofaga Mu [76, 77] (patrz też rozdział VI-1.2). IHF stymuluje ponadto specyficzną inwersję DNA kontrolującą zmianę ekspresji fimbrii typu 1, która jest katalizowana przez dwie rekombinazy: FimB i FimE. W mutantach *ihf* obserwowano zmniejszenie, w porównaniu ze szczepem niezmutowanym, zarówno rekombinacji z udziałem FimB (100-krotne) jak i rekombinacji z udziałem FimE (15 000-krotne) [78].

## VI-4. Replikacja chromosomalnego DNA

IHF jest jednym z wielu białek wiążących się do miejsca inicjacji replikacji (*oriC*) chromosomalnego DNA *E. coli*. IHF wspomaga rozdzielenie nici i utworzenie widełek replikacyjnych [79]. Skład kompleksu białkowo-nukleinowego w regionie *oriC* zmienia się w zależności od stanu fizjologicznego komórki i fazy wzrostu hodowli bakteryjnej. Prawdopodobnie zmiany ilościowe białek FIS i IHF związanych w regionie *oriC* w dużym stopniu regulują tworzenie kompleksu replikacyjnego lub blokowanie replikacji DNA [80].

## VI-5. Regulacja ekspresji genów

Rola białka IHF w regulacji ekspresji genów była tematem artykułów przeglądowych [42, 83]. Staralam się zatem skoncentrować na problemach nie poruszonych poprzednio oraz podać aktualną listę genów *E. coli* regulowanych przez IHF. Sprawdzenie wpływu mutacji *ihfA* na ekspresję genów (mierzoną poziomem mRNA) zlokalizowanych w około 400 segmentach genomu *E. coli* sklonowanych w odpowiednich wektorach fagowych [81] było jedną z niewielu dotąd opublikowanych metod zastosowanych do badania „globalnego” efektu IHF na ekspresję genów. Inną możliwością jest porównanie wzoru dwukierunkowej elektroforezy białek komórkowych w mutantach *ihf* ze wzorem białek w szczepie niezmutowanym [10, 82]. Białka, których ilość jest w istotny sposób zmieniona w szczepach z mutacją *ihf* mogą zostać następnie zidentyfikowane, a geny je kodujące sprawdzone pod względem bezpośredniego wpływu IHF na ich ekspresję. Najczęściej jednak potencjalne miejsca wiązania IHF jest lokalizowane na podstawie obecności sekwencji kanonicznej dla IHF w regionie regulatorowym. Efekt IHF na ekspresję badanego genu jest następnie sprawdzany *in vivo* lub/ i *in vitro*. Tabela 3 zawiera zestawienie genów *E. coli* bezpośrednio regulowanych przez IHF.

## VI-6. IHF a stacjonarna faza hodowli bakteryjnych

Ilość IHF wzrasta w komórce w fazie stacjonarnej a więc można założyć, że jego rola jest ważniejsza w tej fazie hodowli niż w czasie intensywnego wzrostu. IHF jest wymagany do przeżycia bakterii w warunkach głodzenia oraz potrzebny jest do produkcji co najmniej 14-tu białek indukowanych w warunkach limitującej ilości glukozy [82]. Mutanty *ihf* nie wykazują w pełni pewnych charakterystycznych fenotypów fazy stacjonarnej np. zwiększonej oporności na podwyższoną temperaturę czy nadtlenek wodoru (obserwacje własne). Efekt ten może być spowodowany bezpośrednim udziałem IHF w indukcji wielu genów fazy stacjonarnej [84-86], ale nie można wykluczyć, że obserwowane plejotropowe efekty obecności mutacji *ihf* wynikają



**Tabela 3.**Geny *Escherichia coli* regulowane przez IHF

Gen	Funkcja produktu	Efekt IHF	Referencja
<i>aceBAK</i>	wzrost na octanie	pozytywny (6 ×), znosi represję	[99]
<i>adiA</i>	dekarboksylaza argininy	pozytywny	[129]
<i>cadBA</i>	dekarboksylaza lizyny	pozytywny	[129]
<i>aroL</i>	biosynteza aromatycznych aminokwasów	pozytywny, znosi represję	[101]
<i>carAB</i>	biosynteza argininy i piramidyn	pozytywny w warunkach indukcji, negatywny w warunkach represji	[102]
<i>dmsABC</i>	reduktaza DMSO/TMAO	pozytywny	[103]
<i>dps</i>	białko wiążące DNA w fazie stacjonarnej	pozytywny	[84]
<i>daaABCDE</i>	adhezyna z fimbrii	pozytywny (24 ×)	[104]
<i>dppABCD</i>	transport dipeptydów	pozytywny (10 ×)	[105]
<i>fis</i>	białko histono-podobne	pozytywny	[106]
<i>glnHPQ</i>	synteza glutaminianu	pozytywny (in vitro)	[107]
<i>glpTQ</i>	wykorzystanie fosfoglicerolu	negatywny (3 ×)	[108]
<i>hpm</i>	flawohemoglobina	negatywny (1.5 ×)	[109]
<i>htrE</i>	synteza pili typu P	pozytywny (5—6 ×)	[86]
<i>hemA</i>	biosynteza hemu	pozytywny w warunkach tlenowych, negatywny w warunkach beztlenowych	[111]
<i>hycA</i>	oddychanie beztlenowe	pozytywny (2—3 ×)	[112]
<i>hypA</i>	oddychanie beztlenowe	negatywny	[112]
<i>iloBN</i>	biosynteza izoleucyny	pozytywny	[113]
<i>iloGMEDA</i>	biosynteza izoleucyny	pozytywny	[114]
<i>kpsEDUCS</i>	biosynteza antygeny K5	pozytywny (5 ×)	[115]
<i>mtr</i>		negatywny	[116]
<i>narGHIJ</i>	reduktaza azotanowa	pozytywny	[117]
<i>narK</i>	regulacja ekspresji reduktazy azotanowej	pozytywny (4 ×)	[118]
<i>narXL</i>	regulacja ekspresji reduktazy azotanowej	pozytywny (2 ×)	[118]
<i>ndh</i>	NADH dehydrogenaza II	negatywny	[119]
<i>nuoA-N</i>	łańcuch oddechowy	pozytywny w warunkach beztlenowych, brak efektu w warunkach tlenowych	[120]
<i>ompB</i>	regulator biosyntezy poryn	negatywny	[121]
<i>ompC</i>	poryna	negatywny	[122]
<i>ompF</i>	poryna	negatywny (15 ×)	[123]
<i>osmE</i>	regulowany przez warunki osmotyczne	negatywny	[124]
<i>osmY</i>	regulowany przez warunki osmotyczne	negatywny	[85]
<i>pfl</i>	oddychanie beztlenowe	pozytywny	[125]
<i>pheST</i>	syntetaza tRNA	negatywny	[5]
<i>pspA</i>		pozytywny (3 ×)	[110]
<i>sodA</i>	dysmutaza nadtlenkowa zależna od Mn	pozytywny	[126]
<i>sucABCD</i>	enzym cyklu TCA	negatywny (3 ×)	[127]
<i>tdcABC</i>	degradacja treoniny	pozytywny (10 ×)	[128]

z wpływu IHF na regulację ilości białka RpoS, czyli podjednostki sigma polimerazy RNA charakterystycznej dla stacjonarnej fazy hodowli bakterii. IHF nie wywiera bezpośredniego wpływu na transkrypcję genu *rpoS*, ponieważ nie wiąże się w regionie promotora tego genu (nie opublikowane wyniki własne), ale mógłby regulować stabilność transkryptu *rpoS* albo stabilność białka RpoS.

Przy okazji omawiania bezpośredniego udziału IHF w transkrypcji genów zależnych od RpoS warto podkreślić, że promotory zależne od tej podjednostki bardzo często zawierają naturalne miejsce zgięcia DNA [87]. Być może rola IHF w aktywowaniu transkrypcji promotorów zależnych od RpoS polega na zginaniu DNA (jeśli dany promotor nie zawiera naturalnego miejsca zgięcia) w celu umożliwienia rozpoznania promotora przez tę podjednostkę polimerazy RNA.

## VII. HU — białko podobne do IHF

Białko IHF należy do grupy białek dość silnie konserwowanych u różnych bakterii. Białka te wykazują silne podobieństwo sekwencji oraz bardzo zbliżoną strukturę cząsteczki. Białka należące do tej grupy są aktywne w formie dimerycznej. Białko HU, występujące w komórkach w dużej ilości (ok. 30 000 dimerów/komórkę) wiąże DNA w sposób niespecyficzny lub rozpoznaje pewne określone struktury DNA [88, 89]. Na uwagę zasługuje fakt, że u wszystkich badanych bakterii z wyjątkiem *E. coli* i *Salmonella typhimurium*, HU występuje jako homodimer. U *E. coli* HU składa się z dwóch podjednostek wykazujących 69% identyczności sekwencji. Ok. 90% cząsteczek białka występuje w formie heterodimerycznej, jednak jego homodimery są funkcjonalne *in vivo* [90]. Wykazano, że białko HU może przyjąć częściowo funkcje białka IHF pomimo braku specyficzności do określonych sekwencji DNA [91]. U wielu bakterii, w tym bakterii gramodatnich np. *Bacillus subtilis* [92] zidentyfikowano białko HU.

## VIII. Białka podobne do IHF w systemach eukariotycznych

Pewne podobieństwo pomiędzy domenami wiążącymi DNA białka IHF oraz eukariotycznego czynnika transkrypcyjnego TFIID zostało zauważone już dość dawno temu [93]. Podobieństwo to jednakże wydaje się wynikać z faktu, iż oba białka wiążą się do DNA poprzez oddziaływanie z małym rowkiem helisy DNA, a nie z faktu ich jakiegokolwiek filogenetycznego pokrewieństwa.

Znacznie bardziej interesujące są przykłady innych białek eukariotycznych, które wydają się być spokrewnione z podjednostkami IHF. Pochodzące z wirusa zwierzęcego (ang. *African swine fever virus*) białko p11.6, które składa się z 104 aminokwasów wykazuje

znaczny stopień podobieństwa sekwencji do białek HU i IHF [94]. Białko to jest aktywne prawdopodobnie w formie homodimerycznej. Niezwykle interesujące z punktu widzenia ewolucji systemu immunologicznego jest wykazanie istnienia silnego podobieństwa sekwencji pomiędzy białkami RAG II oraz podjednostkami IHF [95] oraz białkami RAG I a białkami niezbędnymi do wbudowania wirusowego DNA do genomu komórki bakteryjnej. Białka RAG II (wspólnie z białkami RAG I) wymagane są do rozpoznania i manipulowania segmentami DNA genów kodujących immunoglobuliny a zatem są niezbędne do prawidłowego funkcjonowania układu immunologicznego kręgowców. Możliwe zatem, że ewolucja całego układu immunologicznego kręgowców została zapoczątkowana poprzez nabycie (transfer genetyczny) przez ich przodka genów kodujących bakteryjne integrazy oraz IHF.

## IX. Uwagi końcowe

Poszczególne białka histono-podobne przynajmniej częściowo dają się zastępować przez inne białka zdolne do zginania DNA lub sekwencje zawierające samoistnie występujące w DNA miejsce zgięcia [91, 96]. Główną rolę białek histono-podobnych (w tym IHF) jest ułatwienie innym regulatorom białkowym specyficznego wiązania się do DNA oraz stabilizacja złożonych kompleksów białkowo-nukleinowych poprzez wywołanie odpowiedniej deformacji (zgięcia) DNA. Poszczególne białka histono-podobne wydają się posiadać pewnego rodzaju „specyficzność”, dotyczącą pozytywnej bądź negatywnej regulacji charakterystycznych grup genów, pozwalającą określić ich rolę jako globalnych regulatorów metabolizmu komórki w pewnych określonych warunkach środowiska. W wielu wypadkach specyficzną rolę, pełnią ją przez białka tego typu, trudno jest kreślić. Wynika to m.in. z faktu nakładania się funkcji białek histono-podobnych oraz ich udziału w bardzo wielu procesach komórkowych. Nie ulega wątpliwości, że udział IHF w metabolizmie komórki bakteryjnej jest bardzo rozległy. Białko to aktywuje ekspresję wielu genów związanych z wirulencją i patogennością oraz tych, które mogłyby być pomocne dla komórki bakteryjnej w oddziaływaniach bakteria-gospodarz. Wydaje się, że istotną rolą IHF jest przedstawienie metabolizmu komórki bakteryjnej na funkcjonowanie wewnątrz organizmu gospodarza.

Artykuł otrzymano 9 lipca 1998 r.

Zaakceptowano do druku 1 października 1998 r.

## Piśmiennictwo

1. Perez-Martin J, de Lorenzo V (1997) *Annu Rev Microbiol* 51: 593-628
2. Miller HI, Friedman DI (1980) *Cell* 20: 711-719
3. Weisberg RA, Freundlich M, Friedman D, Gar-

- dner J, Goosen N, Nash HA, Oppenheim AB, Rouviere-Yaniv J (1996) *Mol Microbiol* **19**: 642
4. Mechulam Y, Fayat G, Blanquet S (1985) *J Bacteriol* **163**: 787-791
  5. Mechulam Y, Blanquet S, Fayat G (1987) *J Mol Biol* **197**: 453-470
  6. Wertheimer SJ, Klotsky RA, Schwartz J (1988) *Gene* **63**: 309-320
  7. Flamm EL, Weisberg RA (1985) *J Mol Biol* **183**: 117-128
  8. Węgleńska A, Jacob B, Sirko A (1996) *Gene* **181**: 85-88
  9. Aviv M, Giladi H, Schreiber G, Oppenheim AB, Glaser G (1994) *Mol Microbiol* **14**: 1021-1031
  10. Bykowski T, Sirko A (1998) *Biochimie — w druku*
  11. Haluzi H, Goitein D, Koby S, Mendelson I, Teff D, Mengeritsky G, Giladi H, Oppenheim AB (1991) *J Bacteriol* **173**: 6297-6299
  12. Highlander SK, Garza O, Brown BJ, Koby S, Oppenheim AB (1997) *FEMS Microb Let* **146**: 181-188
  13. Porter ME, Dorman CJ (1997) *J Bacteriol* **179**: 6537-6550
  14. Hill SA, Samuels DS, Carlson JH, Wilson J, Hogan D, Lubk L, Belland RJ (1997) *Mol Microbiol* **23**: 649-656
  15. Krawczyk B, Kur J (1998) *FEMS Microbiol Lett* **161**: 187-192
  16. Ditto MD, Roberts D, Weisberg RA (1994) *J Bacteriol* **176**: 3738-3748
  17. Berg OG (1992) *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 7501-7505
  18. Granston AE, Nash HA (1993) *J Mol Biol* **234**: 45-59
  19. Boffini A, Prentki P (1991) *Nucl Acids Res* **19**: 1369-1374
  20. Boffini A, Prentki P (1993) *Electrophoresis* **14**: 259-264
  21. Oppenheim AB, Rudd KE, Mendelson I, Teff D (1993) *Mol Microbiol* **10**: 113-122
  22. Boccard F, Prentki P (1993) *EMBO J* **12**: 5019-5027
  23. Engelhorn M, Boccard F, Murtin C, Prentki P, Geiselmann J (1995) *Nucl Acids Res* **15**: 2959-2965
  24. Yang CC, Nash HA (1989) *Cell* **57**: 869-880
  25. Leong JM, Nunes-Duby S, Lesser CF, Youderian P, Susskind MM, Landy A (1985) *J Biol Chem* **260**: 4468-447
  26. Mengeritsky G, Goldenberg D, Mendelson I, Giladi H, Oppenheim AB (1993) *J Mol Biol* **231**: 646-657
  27. Wang S, Cosstick R, Gardner JF, Gumpport RI (1995) *Biochemistry* **34**: 13082-13090
  28. Yang SW, Nash HA (1995) *EMBO J* **14**: 6292-6300
  29. Thompson JF, Landy A (1988) *Nucl Acids Res* **16**: 9687-9705
  30. Sun D, Hurley LH, Harshey R (1996) *Biochem* **35**: 10815-10827
  31. Yang SW, Nash HA (1994) *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 12183-12187
  32. Zullianello L, van Ulsen P, van de Putte P, Goosen N (1995) *J Biol Chem* **270**: 17902-17907
  33. Lee EC, Hales LM, Gumpport RI, Gardner JF (1992) *EMBO J* **11**: 305-313
  34. Nunes-Duby SE, Smith-Mung LI, Landy A (1995) *J Mol Biol* **253**: 228-242
  35. Rice PA, Yang SW, Mizuuchi K, Nash HA (1996) *Cell* **87**: 1295-1306
  36. Abola EE, Bernstein FC, Bryant SH, Koetzle TF, Weng J (1987) W: Allen FH, Bergerhoff G, Sievers R (eds) Data Commission of the International Union of Crystallography, Bonn/Cambridge/Chester, str. 107-132
  37. Nash HA, Robertson CA, Flamm E, Weisberg RA, Miller HI (1987) *J Bacteriol* **169**: 4124-4127
  38. Zullianello L, Gorge de Rosny E, van Ulsen P, van de Putte P, Goosen N (1994) *EMBO J* **13**: 1534-1540
  39. Werner MH, Clore GM, Gronenborn AM, Nash HA (1994) *Current Biology* **4**: 477-487
  40. Zablewska B, Kur J (1995) *Gene* **160**: 131-132
  41. Hiszczyńska-Sawicka E, Kur J (1997) *Plasmid* **38**: 174-179
  42. Freundlich M, Ramani N, Mathew E, Siroko A, Tsui P (1992) *Mol Microbiol* **6**: 2557-2563
  43. Gamas P, Burger AC, Churchward G, Caro L, Galas D, Chandler M (1986) *Mol Gen Genet* **204**: 85-89
  44. Friden P, Voelkel K, Sternglanz R, Freundlich M (1984) *J Mol Biol* **172**: 573-579
  45. Dempsey WB, Fee BE (1990) *Mol Microbiol* **4**: 1019-1028
  46. Dempsey WB (1987) *J Bacteriol* **169**: 4391-4392
  47. Gamas P, Caro L, Galas D, Chandler M (1989) *Mol Gen Genet* **207**: 302-305
  48. Tsai M-M, Fu Y-HF, Deonier RC (1990) *J Bacteriol* **172**: 4603-4609
  49. Di Laurenzio L, Scraba DG, Paranchych W, Frost LS (1995) *Mol Gen Genet* **247**: 726-734
  50. Nelson WC, Howard MT, Sherman JA, Matson SW (1995) *J Biol Chem* **270**: 28374-28380
  51. Stenzel TT, Patel P, Bastia D (1987) *Cell* **49**: 709-717
  52. Dellis S, Feng J, Filutowicz M (1996) *J Mol Biol* **257**: 550-560
  53. Hiszczyńska-Sawicka E, Kur J (1995) *Acta Biochim Polon* **42**: 103-108
  54. Biek DP, Cohen SN (1989) *J Bacteriol* **171**: 2066-2074
  55. Biek DP, Cohen SN (1992) *J Bacteriol* **174**: 785-792
  56. Funnel BE (1991) *J Biol Chem* **266**: 14328-14337
  57. Hayes F, Davis MA, Austin SJ (1993) *J Bacteriol* **174**: 3443-3451
  58. van Rijn PA, Goosen N, Turk SC, van de Putte P (1989) *Nucl Acids Res* **17**: 10203-10212
  59. van Ulsen P, Hillebrand M, Zullianello L, van de Putte P, Goosen N (1996) *Mol Microbiol* **21**: 567-578
  60. van Ulsen P, Hillebrand M, Kainz M, Collard R, Zullianello L, van de Putte P, Gourse RL, Goosen N (1997) *J Bacteriol* **179**: 530-537
  61. Miller HI (1988) W Low KB (red) The recombination of genetic material, Academic Press, Inc San Diego-New York-Berkeley-Boston-Londyn-Sydney-Tokyo-Toronto, str. 361-384
  62. Kosturko LD, Daub E, Murialdo H (1989) *Nucl Acids Res* **17**: 317-334
  63. Hoyt MA, Knight DM, Das A, Miller HI, Echols H (1982) *Cell* **31**: 565-573
  64. Mahajna J, Pppenheim AB, Rattray A, Gottesman M (1986) *J Bacteriol* **165**: 167-174
  65. Giladi H, Koby S, Gottesman ME, Oppenheim AB (1992) *J Mol Biol* **224**: 937-948
  66. Kur J, Hasan N, Szybalski W (1989) *Gene* **81**: 1-15
  67. Nash HA (1990) *TIBS* **15**: 222-227
  68. Clerget M, Boccard F (1996) *J Bacteriol* **178**: 4077-4083
  69. Greenstein D, Zinder ND, Horiuchi K (1988) *Proc Natl Acad Sci USA* **85**: 6262-6266
  70. Skorupski K, Sauer B, Strenberg N (1994) *J Mol Biol* **243**: 268-282
  71. Henthorn KS, Friedman DI (1995) *J Bacteriol* **177**: 3185-3190
  72. Prentki P, Chandler M, Galas DJ (1987) *EMBO J* **6**: 2479-2487
  73. Signon L, Kleckner N (1995) *Genes Dev* **9**: 1123-1136
  74. Makris JC, Nordmann PL, Reznikoff WS (1990) *J Bacteriol* **172**: 1368-1373
  75. May EW, Grindley ND (1995) *J Mol Biol* **247**: 578-587
  76. Lelung PC, Teplow DB, Harshey RM (1989) *Nature (Lond)* **338**: 656-658
  77. Mizuuchi M, Mizuuchi K (1989) *Cell* **58**: 399-408
  78. Blomfield IC, Kulasekara DH, Eisenstein BI (1997) *Mol Microbiol* **23**: 705-717
  79. Hwang DS, Kornberg A (1992) *J Biol Chem* **267**: 23083-23086
  80. Cassler MR, Grimwalde JE, Leonard AC (1995) *EMBO J* **14**: 5833-5841
  81. Chuang S, Daniels DL, Blattner FR (1993) *J Bacteriol* **175**: 2026-2036
  82. Nyström T (1995) *J Bacteriol* **177**: 5707-5710
  83. Goosen N, van de Putte P (1995) *Mol Microbiol* **16**: 1-7
  84. Altuvia S, Almiron M, Huisman G, Kolter R, Storz G (1994) *Mol Microbiol* **13**: 265-272
  85. Lange R, Barth M, Hengge-Aronis R (1993) *J Bacteriol* **175**: 7910-7917
  86. Raina S, Missiakas D, Baird L, Kumar S, Gorgopoulos C (1993) *J Bacteriol* **175**: 5009-5021
  87. Espinosa-Urgel M, Tormo A (1993) *Nucl Acids Res* **21**: 3667-3670
  88. Pontiggia A, Nagri A, Beltrame M, Bianchi ME

- (1993) *Mol Microbiol* 7: 343-350
89. Bonnefoy E, Takahashi M, Rouviere-Yaniv J (1994) *J Mol Biol* 242: 116-129
  90. Wada M, Kano Y, Imamoto F, Kano Y (1988) *J Mol Biol* 204: 581-591
  91. Segall AM, Goodman SD, Nash HA (1994) *EMBO J* 13: 4536-4548
  92. Micka B, Groch N, Heinemann U, Marahiel MA (1991) *J Bacteriol* 173: 3191-3198
  93. Nash HA and Granston AE (1991) *Cell* 67: 1037-1038
  94. Borca MV, Irusta OM, Kutish GF, Carrillo C, Afonso CL, Burrage T, Neilan JG, Rock DL (1996) *Arch Virol* 141: 301-313
  95. Bernstein RM, Schluter SF, Bernstein H, Marchalonis JJ (1996) *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 9454-9459
  96. Parekh BS, Hatfield GW (1996) *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 1173-1177
  97. Craig and Nash (1984) *Cell* 39: 707-716
  98. Goodrich JA, Schwartz ML, McClure WR (1990) *Nucl Acids Res* 18: 4993-5000
  99. Resnik E, Pan B, Ramani N, Freundlich M, Laporte DC (1996) *J Bacteriol* 178: 2715-2717
  100. Stim KP, Bennett GN (1993) *J Bacteriol* 175: 1221-1234
  101. Lawley B, Pittard AJ (1994) *J Bacteriol* 176: 6921-6930
  102. Charlier D, Roovers M, Gigit D, Huysveld N, Pierard A, Glandsdorff N (1993) *Mol Gen Genet* 237: 273-286
  103. McNicholas PM, Chiang RC, Gunsalus RP (1998) *Mol Microbiol* 27: 197-208
  104. Bilge SS, Apostol JM, Fullner KJ, Moseley SL (1993) *Mol Microbiol* 7: 993-1006
  105. Abouhamad WN, Manson MD (1994) *Mol Microbiol* 14: 1077-1092
  106. Pratt TS, Steiner T, Feldman LS, Walker KA, Osuna R (1997) *J Bacteriol* 179: 6367-6377
  107. Claverie-Martin F, Magasanik B (1991) *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 1631-1635
  108. Yang B, Gerhardt SG, Larson TJ (1997) *Mol Microbiol* 24: 511-521
  109. Membrillo-Hernandez J, Cook GM, Poole RK (1997) *Mol Gen Genet* 254: 599-603
  110. Weiner L, Brissette JL, Ramani N, Model P (1995) *Nucl Acids Res* 23: 2030-2036
  111. Darie S, Gunsalus RP (1994) *J Bacteriol* 176: 5270-5276
  112. Hopper S, Babst M, Schlesong V, Fischer HM, Hennecke H, Bock A (1994) *J Biol Chem* 269: 19597-19604
  113. Tsui P, Freundlich M (1990) *Mol Gen Genet* 223: 349-352
  114. Tsui P, Freundlich M (1988) *J Mol Biol* 203: 817-820
  115. Simpson DA, Hammarton TC, Roberts IS (1996) *J Bacteriol* 178: 6466-6474
  116. Yang J, Camakaris H, Pittard AJ (1996) *J Bacteriol* 178: 6389-6393
  117. Rabin RS, Callins LA, Steward V (1992) *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 8701-8705
  118. Darwin AJ, Steward V (1995) *J Bacteriol* 177: 3865-3869
  119. Greem J, Anjum MF, Guest JR (1997) *Microbiol* 143: 2865-2875
  120. Bangaers J, Zoske S, Weidner U, Uden G (1995) *Mol Microbiol* 16: 521-534
  121. Tsui L, Huang P, Freundlich M (1991) *J Bacteriol* 173: 5800-5807
  122. Huang L, Tsui P, Freundlich M (1990) *J Bacteriol* 172: 5293-5298
  123. Tsui P, Helu V, Freundlich M (1988) *J Bacteriol* 170: 4950-4953
  124. Gutierrez C, Gordia S, Bounassie S (1995) *Mol Microbiol* 16: 553-563
  125. Sirko A, Zehelein E, Freundlich M, Sawers G (1993) *J Bacteriol* 175: 5769-5777
  126. Compan I, Touati D (1993) *J Bacteriol* 175: 1687-1696
  127. Park SJ, Chao G, Gunsalus RP (1997) *J Bacteriol* 179: 4138-4142
  128. Wu YF, Datta P (1992) *J Bacteriol* 174: 233-240
  129. Rowbury RJ (1997) *Lett Appl Microbiol* 24: 319-328

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

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

## SPRAWOZDANIE z działalności Zarządu Głównego Polskiego Towarzystwa Biochemicznego XV Kadencji (1995-1998) przedstawione na XVI Walnym Zebraniu Członków w Białymstoku w dniu 16 września 1998 r.

Zarząd Główny XV kadencji działał w składzie:

**Prezydium:** prezes — prof. dr hab. **Liliana Konarska**  
wiceprezes — prof. dr hab. **Jolanta Barańska**  
sekretarz — doc. dr hab. **Małgorzata Balińska**  
(rezygnacja z funkcji od 26.10.1997)  
skarbnik — prof. dr hab. **Zofia Poremska**

**Członkowie Prezydium Zarządu:** prof. dr hab. **Edward Bańkowski**  
prof. dr hab. **Stanisław Bielecki**  
prof. dr hab. **Roman Tarnawski**

**Członkowie Zarządu:** prof. dr hab. **Jan Głogowski**  
prof. dr hab. **Teresa Jakubowicz**  
prof. dr hab. **Aleksandra Kubicz**  
prof. dr hab. **Piotr Laidler**  
prof. dr hab. **Maciej Nałęcz**  
prof. dr hab. **Ryszard Oliński**  
prof. dr hab. **Jerzy Popinigis**  
prof. dr hab. **Tomasz Twardowski**  
dr **Teresa Wesołowska**

Zarząd Główny XV kadencji działał poprzez **Oddziały terenowe PTBioch**

w <b>Białymstoku</b>	— przewodniczący doc. dr hab. <b>Jerzy Pałka</b>
w <b>Gdańsku</b>	— przewodniczący doc. dr hab. <b>Michał Woźniak</b>
w <b>Katowicach</b>	— przewodnicząca doc. dr hab. <b>Iwona Żak</b>
w <b>Krakowie</b>	— przewodniczący prof. dr hab. <b>Zdzisław Żak</b>
w <b>Lublinie</b>	— przewodnicząca dr <b>Maria Sanecka-Obacz</b>
w <b>Łodzi</b>	— przewodnicząca prof. dr hab. <b>Wanda M. Krajewska</b>
w <b>Olsztynie</b>	— przewodniczący prof. dr hab. <b>Jan Głogowski</b>
w <b>Poznaniu</b>	— przewodniczący prof. dr hab. <b>Witold Walerych</b>
w <b>Szczecinie</b>	— przewodniczący dr <b>Tadeusz Ogoński</b>
w <b>Toruniu</b>	— przewodniczący dr <b>Antoni Leźnicki</b>
w <b>Warszawie</b>	— przewodnicząca prof. dr hab. <b>Barbara Grzelakowska-Sztabert</b>
w <b>Wrocławiu</b>	— przewodnicząca prof. dr hab. <b>Maria Malicka-Błaszkiwicz</b>

W końcu XV kadencji liczba członków Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, zgrupowanych w 12 oddziałach terenowych, osiągnęła liczbę 1778 osób (Tab. 1) i zwiększyła się o 171 osób w stosunku do roku 1995 (Tab. 2). W roku 1995, 1996, 1997 i pierwszej połowie roku 1998 przyjęto, odpowiednio 76, 66, 67 i 33 nowych członków, w tym, odpowiednio 41, 29, 30 i 13 członków studentów (Tab. 3). Członków, którzy z różnych powodów zalegali ponad 2 lata z płaceniem składek przeniesiono w poczet tzw. członków biernych, tracących jednocześnie część przywilejów, jak ulgi w prenumeracie „Postępów Biochemii”, opłacie za uczestnictwo w zjazdach PTBioch itp. Liczba członków biernych utrzymywała się na poziomie 27—30%, a w roku sprawozdawczym wynosi aż 658 osób. Pozostali członkowie Towarzystwa płacą składkę regularnie. Jej wysokość w minionej kadencji wynosiła 15 zł w latach 1995-1997 i 20 zł w roku 1998. Składka dla członków studentów wynosiła odpowiednio 5 zł i 7 zł Członkowie honorowi i emeryci składek członkowskich nie płacą.

**Tabela 1.**

Polskie Towarzystwo Biochemiczne stan osobowy w dniu 30 czerwca 1998 r.

Oddział	Liczba członków ogółem (3+4+5+7)	W tym członkowie				
		honorowi	emeryci	płacący składki		zawieszeni
				ogółem	w tym studenci	
1	2	3	4	5	6	7
Białystok	57	—	5	30	3	22
Gdańsk	110	1	—	61	6	48
Katowice	105	—	2	80	10	23
Kraków	104	1	6	62	5	35
Lublin	114	1	11	80	7	22
Łódź	165	—	7	112	11	46
Olsztyn	54	—	1	32	1	21
Poznań	191	—	4	98	8	89
Szczecin	71	1	6	59	8	5
Toruń	37	—	—	19	1	18
Warszawa	632	6	35	326	81	265
Wrocław	138	1	5	68	13	64
RAZEM	1778	11	82	1027	154	658

**Tabela 2.**

Liczba członków Polskiego Towarzystwa Biochemicznego w latach 1995-1998

Oddział	1995	1996	1997	1998*
Białystok	54	55	57	57
Gdańsk	88	100	106	110
Katowice	83	90	100	105
Kraków	93	95	98	104
Lublin	105	109	115	114
Łódź	161	161	161	165
Olsztyn	54	52	54	54
Poznań	171	179	184	191
Szczecin	50	52	58	71
Toruń	32	35	35	37
Warszawa	590	602	618	632
Wrocław	126	131	133	138
Ogółem	1607	1661	1720	1778
w tym zawieszeni	459	455	529	658

\* Stan na 30 czerwca

**Tabela 3.**

Liczba nowoprzyjętych członków Polskiego Towarzystwa Biochemicznego w latach 1995-1998

Oddział	Przyjęci w roku:							
	1995	Wy tym studenci	1996	W tym studenci	1997	W tym studenci	1998 do 30.06.95	W tym studenci
Białystok	3	1	1	—	3	2	—	—
Gdańsk	2	—	12	5	6	1	3	1
Katowice	4	2	5	2	10	4	3	2
Kraków	1	1	1	—	4	1	5	3
Lublin	4	2	7	4	6	3	1	—
Łódź	13	9	2	—	3	—	1	—
Olsztyn	6	1	—	—	2	—	—	—
Poznań	4	1	12	3	3	—	7	3
Szczecin	4	2	—	—	6	6	2	—
Toruń	—	—	2	—	—	—	2	1
Warszawa	28	17	20	12	18	10	9	3
Wrocław	7	5	4	3	6	3	—	—
Razem	<b>76</b>	<b>41</b>	<b>66</b>	<b>29</b>	<b>67</b>	<b>30</b>	<b>33</b>	<b>13</b>

Ogólnie sprawy finansowe Towarzystwa układały się zadawalająco. Dzięki dofinansowaniu ze strony Komitetu Badań Naukowych możliwe było regularne i na wysokim poziomie wydawanie naszych czasopism i monografii oraz organizacja zjazdów i sympozjów. Ważną pozycję w budżecie Towarzystwa stanowi od 2 lat dotacja Molecular Research Center z San Sineti, USA, prowadzonego przez naszego kolegę Piotra Chomczyńskiego, a przeznaczona na najważniejszą nagrodę Towarzystwa — im. J. K. Parnasa oraz dotacja firmy Aldrich-Sigma przeznaczona na nagrodę za najlepszą pracę z polskiego laboratorium, z dziedziny chemii i biochemii kwasów nukleinowych. W okresie sprawozdawczym budżet Towarzystwa wspierany był także przez Instytut Biologii Doświadczalnej PAN im. M. Nenckiego i Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN w Warszawie oraz Instytut Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu.

Zarząd Główny, przy współpracy z Zarządami Oddziałów, prowadził działalność statutową poprzez sekcje, komisje i zespoły powołane do zadań szczegółowych. Zgodnie ze Statutem Towarzystwa, każdego roku odbyły się cztery plenarne posiedzenia Zarządu Głównego z udziałem przedstawicieli Oddziałów, organizatorów zjazdów naukowych i innych zapraszanych gości.

Dyżury członków Prezydium odbywały się we wtorki w siedzibie Zarządu Głównego, która od roku 1993 mieści się w gościnnych murach Instytutu Biologii Doświadczalnej PAN im. M. Nenckiego przy ul. Pasteura 3 (pokój 633). Dzięki dobrym warunkom lokalowym i pomocy materialnej IBD możliwe było wyposażenie siedziby Zarządu Głównego w sprzęt pozwalający na sprawne działanie sekretariatu i łatwy kontakt z Oddziałami terenowymi i ośrodkami naukowymi w kraju i za granicą (**tel: 658-20-99, fax: 22-53-42, e-mail: ptbioch@nencki.gov.pl**). Od roku 1997 Towarzystwo ma własne strony internetowe: (**http://www.ptbioch.edu.pl**). Biuro Zarządu Głównego oraz redakcje „Acta Biochemica Polonica” i „Postępów Biochemii” są obecnie zlokalizowane w jednym budynku, co usprawnia pracę i daje możliwość znacznych oszczędności przez korzystanie ze wspólnych pomieszczeń i sprzętu elektronicznego. Zarząd Główny dysponuje już odpowiednią nowoczesną bazą danych pozwalającą na prowadzenie elektronicznej ewidencji członków Towarzystwa. Ułatwi to z pewnością pracę sekretariatu Zarządu Głównego następnych kadencji.

Głównym statutowym celem Towarzystwa jest popieranie rozwoju biochemii, popularyzacja jej osiągnięć oraz integracja środowiska biochemicznego. Zarząd Główny XV Kadencji realizował te cele poprzez:

- działalność wydawnicza: „Postępy Biochemii”, „Acta Biochemica Polonica”, seria „Monografie Biochemiczne” i „Listy do Członków Polskiego Towarzystwa Biochemicznego”
- premiowanie najbardziej wartościowych osiągnięć naukowych poprzez konkursy i nagrody:

im. prof. Jakuba Karola Parnasa  
 im. prof. Bolesława Skarżyńskiego  
 im. prof. Włodzimierza Mozołowskiego  
 im. prof. Janiny Opieńskiej-Blauth  
 im. prof. Antoniego Dmochowskiego

nagrody za najlepszą pracę z dziedziny biochemii i chemii kwasów nukleinowych

- popularyzację osiągnięć nauki światowej poprzez konkursy na najlepiej przygotowany i wygłoszony wykład z dziedziny biochemii i biologii molekularnej
- popularyzację i popieranie staży naukowych krajowych i zagranicznych fundowanych przez FEBS
- współorganizację dorocznych Zjazdów Towarzystwa
- inspirowanie i organizowanie monotematycznych sesji naukowych
- popieranie działalności związanej z unowocześnianiem nauczania biochemii i biotechnologii, na poziomie akademickim, poprzez organizację sesji i spotkań poświęconych dydaktyce, a także ustanowienie w roku 1996 nagrody im. prof. Antoniego Dmochowskiego za wybitne osiągnięcia dydaktyczne.
- integrację środowiska biochemicznego poprzez redakcję „Listów do Członków Polskiego Towarzystwa Biochemicznego” oraz redakcję „Postępów Biochemii”.

## Działalność wydawnicza

**Kwartalnik „Postępy Biochemii”** rozwija się pomyślnie. W XV Kadencji redaktor naczelny prof. Zofia Zielińska oraz pozostali redaktorzy — prof. Grażyna Palamarczyk, prof. Andrzej Jerzmanowski, prof. Liliana Konarska (od 1997), dr Anna Szakiel i dr Iwona Fijałkowska (od 1997), inż. Jolanta Grzybowska oraz sekretarz redakcji Barbara Zarzycka, a od roku 1997 mgr Hanna Laskowska, dbali o punktualne ukazywanie się pisma oraz o wysoki poziom merytoryczny i nowoczesną szatę graficzną. Prace publikowane w kwartalniku zawierają informacje z zakresu współczesnych kierunków badań w naukach biologicznych, przybliżając najnowsze osiągnięcia światowych pracowni z wielu dziedzin, takich jak biochemia, patobiochemia, biologia molekularna, genetyka molekularna, biotechnologia oraz medycyna molekularna. Kwartalnik jest cennym uzupełnieniem podręczników akademickich. Stanowi on pomoc w nauczaniu studentów wydziałów biologicznych Uniwersytetów, a także Akademii Rolniczych, Akademii Medycznych i Politechnik. Kwartalnik jest dotowany przez KBN i wspierany przez IBD PAN. Dzięki temu może ukazywać się regularnie i w nowoczesnej formie. „Postępy Biochemii” indeksowane są w Medline i Agrolibrex.

Zainteresowanie kwartalnikiem jest bardzo duże zarówno ze strony autorów jak i czytelników. Wpływy ze sprzedaży są jednak coraz mniejsze. Mimo niskiej ceny (od dwóch lat cena całego rocznika wynosi 15 zł dla członków Towarzystwa, 30 zł dla niezrzeszonych i 60 zł dla instytucji) liczba osób prenumerujących jest bardzo mała (Tab. 4). Stale prowadzona jest sprzedaż pojedynczych numerów i całych roczników kwartalnika w Zarządzie Głównym oraz podczas zjazdów i sympozjów organizowanych przez PTBioch. Część egzemplarzy rozprowadzana jest nieodpłatnie wśród nowoprzyjmowanych członków i jako egzemplarze reklamowe.

W okresie sprawozdawczym do redakcji wpłynęły 163 artykuły, z których 118 ukazało się drukiem. W roku 1995 i 1997 wydane zostały zeszyty specjalne „Postępów Biochemii”. Nr 5, t. 41 (1995) wydany został

**Tabela 4.**

Prenumerata *Postępów Biochemii* w latach 1995-1998

Oddział	Rok			
	1995	1996	1997	1998 (do 30 VII)
Białystok	10	10	9	7
Gdańsk	15	17	22	21
Katowice	23	23	26	22
Kraków	18	27	25	27
Lublin	36	39	32	27
Łódź	38	33	38	28
Olsztyn	9	8	9	8 <sup>y</sup>
Poznań	16	22	20	12
Szczecin	14	15	15	21
Toruń	8	6	5	6
Warszawa	59	66	68	55
Wrocław	14	18	16	12
RAZEM	260	284	285	246



w języku angielskim i dedykowany był profesorowi Dawidowi Shugarowi z Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN w Warszawie, członkowi honorowemu Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, z okazji 80 rocznicy urodzin. Nr 5, t. 43 (1997) w całości poświęcony jest profesorowi Jakubowi K. Parnasowi (1884-1949), zawiera obszerne sprawozdanie z dedykowanej Jego pamięci I Polsko-Ukraińskiej Konferencji Biochemicznej (Lwów, 9-11 września, 1996) a także wiele nieznanych dotąd faktów z życia tego wielkiego uczonego.

Informacje o kwartalniku, wraz ze spisem treści kolejnych zeszytów, znajdują się w Internecie na stronach [www.PTBioch](http://www.PTBioch).

**Kwartalnik „Acta Biochimica Polonica”** publikuje oryginalne prace doświadczalne w języku angielskim. Kwartalnik redagowany jest przez zespół: Daniela Barszcz, Alicja Drabikowska, Jarosław Kuśmierk, Piotr P. Stępień, Kazimierz L. Wierzchowski, Lech Wojtczak. Redaktorem naczelnym jest prof. Konstancja Raczyńska-Bojanowska, sekretarzem redakcji Małgorzata Basaj, a 18-osobowej Radzie Redakcyjnej przewodniczy prof. Lech Wojtczak. Od grudnia 1992 roku czasopismo jest wydawane przez Polskie Towarzystwo Biochemiczne wspólnie z Komitetem Biochemii i Biofizyki PAN. Kwartalnik jest wydawany z pomocą finansową KBN, co zapewnia regularne ukazywanie się czasopisma i nowoczesną szatę graficzną. „Acta Biochimica Polonica” indeksowany jest przez Current Contents, BIOSIS, Chemical Abstracts, Excerpta Medica, Medline.

W okresie sprawozdawczym do redakcji wpłynęło ponad 380 prac, z których drukiem ukazało się, w tomie 43 (1996), 44 (1997) i 45 (1998), odpowiednio 85, 88 i 111 prac autorów polskich i zagranicznych. Oryginalne prace doświadczalne stanowiły, odpowiednio 80%, 60% i 70%, krótkie doniesienia 9%, 15% i 18%, a prace przeglądowe typu „mini-review”, odpowiednio 11%, 25% i 12% wszystkich prac. Objętość wydanych arkuszy systematycznie rosła od 94 w roku 1996, 140 w 1997 do ok. 170 w roku sprawozdawczym 1998.

Informacje o *Acta Biochimica Polonica*, wraz z instrukcją dla autorów i streszczeniami prac znajdują się w Internecie na stronach Current Contents oraz na stronach [www.PTBioch](http://www.PTBioch).

## Monografie Biochemiczne

Dzięki pomocy finansowej Komitetu Badań Naukowych kontynuowano wydawanie monografii. Redaktorem serii jest prof. Liliana Konarska. W okresie sprawozdawczym ukazały się następujące pozycje:

W roku **1995**

— „*Molekularne mechanizmy przekazywania sygnałów w komórce*” — praca zbiorowa pod red. L. Konarskiej, wydawca PWN, ISBN 83-01-11943-8

— „*Włodzimierz Mozołowski. W stulecie urodzin*” — Monografia opracowana przez prof. W. Makarewicza, wydawca PTBioch, Oddział Gdański, Nr 40, ISBN 83-903580-O-X

w roku **1996**

— „*Hormony glikoproteinowe: struktura, biosynteza i funkcja ich oligosacharydów*”. Autorzy: Iwona Żak i Marian Drózdź, wydawca: PTBioch, Zarząd Główny, Nr 41, ISBN 83-903580-1-8

w roku **1997**

— rozpoczęte zostały i nadal trwają prace nad „*Leksykonem nowych nazw i pojęć w biochemii i biologii molekularnej*”, jednocześnie w wersji skrypcyjnej i Internetowej. Wersja Internetowa jest już dostępna, na razie tylko w formie słownika polsko-angielskiego. Objasnienia haseł będą umieszczane sukcesywnie po opracowaniu przez autorów, po recenzjach i ostatecznym zredagowaniu przez redaktora serii.

w roku **1998**

— „*Rola białek motorycznych w mitozie*”

Autorzy: Katarzyna Krauze i Robert Makuch, wydawca: PTBioch, Zarząd Główny, Nr 42, ISBN 83-903580-2-6.

Publikacje PTBioch zawierają najnowsze informacje dotyczące omawianych tematów. Stanowią cenne uzupełnienie podręczników akademickich. Mogą z nich korzystać zarówno wykładowcy i asystenci, jak i studenci oraz nauczyciele szkół średnich.

Wszystkie wydawnictwa spotkały się z przychylną oceną recenzentów i czytelników.

## Biuletyn Towarzystwa „Listy do Członków PTBioch”

Biuletyn jest redagowany przez dr Teresę Wesołowską i wydawany w Szczecinie. W ciągu, XV Kadencji ukazało się 12 Listów (Nr 38-49) informujących o działalności naszego Towarzystwa. Biuletyn przekazuje aktualne wiadomości dotyczące pracy Zarządu Głównego, pracy Oddziałów oraz informuje o naukowych imprezach w kraju i za granicą. Biuletyn jest otwarty na wszelkie informacje z Oddziałów i oczekuje na

ściślejszą współpracę. Forma redagowania listów, życzliwy i ciepły stosunek redaktora biuletynu do Czytelników zjednuje sympatię członków naszego Towarzystwa, powiększa grono czytelników i integruje środowisko biochemiczne.

## Nagrody

Nagroda im. prof. **Jakuba Karola Parnasa**, za najlepszą pracę doświadczalną z zakresu biochemii wykonaną w pracowni na terenie Polski, była przyznawana regularnie i wręczana podczas uroczystości otwarcia dorocznego Zjazdu Polskiego Towarzystwa Biochemicznego. W okresie sprawozdawczym otrzymali ją:

— w roku **1996**

**Alicja Wawrzynów i Maciej Żylicz**, za pracę pt. „Divergent effects of ATP on the binding of the DnaK and DnaJ chaperones to each other, or to their various native and denatured protein substrates” opublikowaną w *J. Biol. Chem.* 270 (33)

— w roku **1997**

**Danuta Płochocka, Marek Wełnicki, Piotr Zielenkiewicz i Włodzimierz Zagórski-Ostoja**, za pracę pt. „Three-dimensional model of the potyviral genome-linked protein” opublikowaną w *Proc. Natl. Sci. USA* 93 (1996) 12150-12154.

— w roku **1998**

**Marek Napierała i Włodzimierz J. Krzyżosiak**, za pracę pt. „CUG repeats present in myotonin kinase RNA form metastable „slippery” hairpins” opublikowaną w *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 31079-31085.

Konkurs mógł się odbywać dzięki pracy wielu osób, które wchodziły w skład komisji. W kolejnych latach 1996-1998, byli to:

### Przewodniczący:

1. Prof. Jan Barciszewski (1996) ICB PAN, Poznań
2. Prof. Grzegorz Węgrzyn (1997 i 1998) UG, Gdańsk

### Członkowie:

1. Prof. Jolanta Barańska (1996) IBD PAN, Warszawa
2. Prof. Tomasz Biliński (1997) WSP, Rzeszów
3. Prof. Piotr Cegłowski (1997) IBB PAN, Warszawa
4. Prof. Wiesław Deptuła (1998) US, Szczecin
5. Prof. Mieczysław Chorąży (1997) Centrum Onkologii, Gliwice
6. Prof. Witold Filipowicz (1996) Fridrich Miescher Inst., Basel
7. Prof. Marek Gniazdowski (1996) AM, Łódź
8. Dr Anna Goc (1997) UMK, Toruń
9. Dr Monika Hryniewicz (1998) IBB PAN, Warszawa
10. Prof. Mariusz Jaskólski (1998) ICB PAN, Poznań
11. Prof. Adam Jaworski (1997) CMW PAN, Łódź
12. Prof. Andrzej B. Legocki (1997) ICB PAN, Poznań
13. Prof. Zbigniew Lorkiewicz (1997) UMCS, Lublin
14. Prof. Ryszard Oliński (1996) AM, Bydgoszcz
15. Prof. Marta Pasenkiewicz-Gierula (1998) UJ, Kraków
16. Dr Jan A. Rafalski (1996) E. I. Pont, USA
17. Prof. Joanna Rzeszevska-Wolny (1998) Centrum Onkologii, Gliwice
18. Prof. Anna Skorupska (1996) UMCS, Lublin
19. Prof. Kazimierz Strzałka (1996) UJ, Kraków
20. Prof. Jan Szopa (1997) UW, Wrocław
21. Prof. Zofia Szweykowska (1998) UAM, Poznań
22. Prof. Waclaw Szybalski (1998) Univ. Wisconsin, USA
23. Prof. Grzegorz Węgrzyn (1996) UG, Gdańsk
24. Prof. Krystyna I. Wolska (1998) UW, Warszawa
25. Dr Jolanta Zakrzewska-Czerwińska (1996 i 1998) IITD PAN, Wrocław
26. Dr Alicja Ziemienowicz (1998) Friedrich Miescher Inst., Basel

Nagroda im. prof. **Bolesława Skarżyńskiego** za najlepszy artykuł przeglądowy opublikowany w „*Postęпах Biochemii*” otrzymali:

— w roku **1996**

**Barbara Grzelakowska-Sztabert** za pracę pt. „Regulacja cyklu komórkowego — udział białkowych inhibitorów kinaz cyklino-zależnych” t. 41, Nr 2.

— w roku **1997**

**Bogdan Falkiewicz i Bogdan Liberek** za prace: pt. „Budowa i funkcja antygenów zgodności tkankowej (MHC) klasy I”, t. 42, Nr 1 i pt. „Budowa i funkcja antygenów zgodności tkankowej (MHC) klasy II”, t. 42, Nr 4

— w roku **1998**

**Andrzej Kasprzak** za pracę pt. „Jak funkcjonuje miozyna?”, t. 43, Nr 3

W skład komisji konkursowej wchodził:

#### Przewodniczący:

1. Prof. Andrzej Jerzmanowski (1996) UW, Warszawa
2. Prof. Grażyna Palmarczyk (1997) IBB PAN, Warszawa
3. Prof. Zofia Zielińska (1998) IBD PAN, Warszawa

#### Członkowie:

1. Doc. Grażyna Adler (1996) CMKP, Warszawa
2. Doc. Małgorzata Balińska (1996) IBD, Warszawa
3. Doc. Joanna Rzeszewska-Wolny (1996) Centrum Onkologii, Gliwice
4. Prof. Krzysztof Staroń (1996) UW, Warszawa
5. Doc. Jerzy Bal (1997) IMD, Warszawa
6. Prof. Krzysztof Zwierz (1997) AM, Białystok
7. Prof. Tadeusz Szumiło (1997) AM, Lublin
8. Prof. Zdzisław Żak (1997) UJ, Kraków
9. Prof. Mariusz Żydowo (1997) AMG, Gdańsk
10. Prof. Grzegorz Bartosz (1998) UŁ, Łódź
11. Dr Iwona Fijałkowska (1998) IBB PAN, Warszawa
12. Doc. Zdzisław Krawczyk (1998) Inst. Onkologii, Gliwice
13. Doc. Jarosław Marszałek (1998) AMG, Gdańsk
14. Prof. Jerzy Popinigis (1998) AWF, Gdańsk

W konkursie im. prof. **Włodzimierza Mozołowskiego** za najlepszą pracę przedstawianą na corocznym Zjeździe Polskiego Towarzystwa Biochemicznego przez młodego biochemika (do lat 30), nagrodzeni zostali:

— w roku **1995**

**Agnieszka Szalewska-Pałasz**, za prezentację dwóch prac:

„Niezdolność faga  $\lambda$  do lizogenizacji mutantów *Escherichia coli* rpoA341 wynika z drastycznie obniżonej transkrypcji z promotorów pozytywnie regulowanych przez aktywator CII” i „Obniżony poziom wczesnych transkryptów litycznych faga  $\lambda$  w mutancie *Escherichia coli* rpoA341 nie zakłóca rozwoju litycznego faga”.

- Adam Sokala (wyróżnienie)
- Grażyna Mosieniak (wyróżnienie)
- Alicja Węgrzyn (wyróżnienie)

— w roku **1996**

nagrodę otrzymała **Ewa Missol**, za prezentację pracy pt. „Wykorzystanie liposomów kationowych do wprowadzenia in vivo samobójczego genu dezaminazy cytozyny z *E. coli*”

- Alicja Węgrzyn (wyróżnienie)
- Mariusz Więckowski (wyróżnienie)

— w roku **1997**

dwie równorzędne nagrody otrzymali:

**Marcin Schmidt**, za prezentację pracy pt. „Ludzki homolog genu lethal(2) neighbour of tid *Drosophila melanogaster* jako nowy marker zmian nowotworowych”

**Magdalena Pęska**, za pracę pt. „Współdziałanie (*cross-talk*) różnych dróg sygnałowych w regulacji ekspresji genu dekarboksylazy ornitynowej (ODC) w nerce mysiej”

W skład komisji konkursowych wchodziłi:

**Przewodniczący:**

1. Prof. Lech Wojtczak (1995) Warszawa
2. Prof. Andrzej Klejn (1996) Kraków
3. Prof. Jerzy Popinigis (1997) Gdańsk

**Członkowie:**

1. Prof. Halina Augustyniak (1995) Poznań
2. Prof. Ewa Bartnik (1995) Warszawa
3. Prof. Grzegorz Bartosz (1997) Łódź
4. Prof. Andrzej Jerzmanowski (1995) Warszawa
5. Prof. Barbara Kłapcińska (1997) Katowice
6. Prof. Janina Kwatkowska-Korczak (1996) Wrocław
7. Prof. Barbara Lipińska (1997) Gdańsk
8. Doc. Anna Lityńska (1996) Kraków
9. Prof. Jerzy Papinigis (1996) Gdańsk
10. Prof. Zofia Walter (1997) Łódź
11. Prof. Mariusz Żydowo (1995, 1996) Gdańsk

Nagrodę im. prof. **Janiny Opieńskiej-Blauth** za szczególnie wartościowe prace badawcze, zgłoszone i przedstawione na Zjeździe PTBioch przez studentów, otrzymali:

— w roku **1995**

**Krzysztof Kobiela**, za prezentację pracy pt. „Podłoże molekularne zespołu Christ-Siemens-Touraine” ponadto wyróżnienia otrzymali: Dobrawa Lisiecka, Magdalena Stańczyk i Dorota Ściegłińska, w roku **1996**

nagrodę otrzymał **Maciej Wiznerowicz**, za prezentację pracy pt. „Konstrukcja dwuciestronowych wektorów retrowirusowych dla celów terapii genowej nowotworów u ludzi”, wyróżnienie otrzymał Borys Wróbel

— w roku **1997**

nagrodzony został **Tomasz Wojciechowski**, za prezentację pracy pt. „Histochemiczna metoda wykrywania produktów peroksydacji lipidów”

W skład komisji konkursowej wchodziłi:

**Przewodniczący:**

1. Prof. Tomasz Borkowski (1995, 1996, 1997) Lublin

**Członkowie:**

1. Prof. Jerzy Duszyński (1995) Warszawa
2. Prof. Zygmunt Machoy (1997) Szczecin
3. Dr Tadeusz Ogoński (1997) Szczecin
4. Dr Maria Sanecka-Obacz (1995, 1996, 1997) Lublin
5. Prof. Roman Tarnawski (1995) Katowice
6. Dr Teresa Wesołowska (1995, 1996, 1997) Szczecin
7. Doc. Iwona Żak (1995) Katowice
8. Prof. Zdzisław Żak (1996) Kraków

Od roku **1996** przyznawana jest, co dwa lata, nagroda im. prof. **Antoniego Dmochowskiego**, za wybitne osiągnięcia dydaktyczne w dziedzinie biochemii.

Nagroda ta ustanowiona została z inicjatywy Łódzkiego Oddziału PTBioch. W jej skład wchodzi dyplom i medal z brązu, ufundowany przez Zarząd Główny PTBioch, wykonany w Łodzi staraniem kolegów z Oddziału Łódzkiego.

— W pierwszej edycji konkursu, w roku **1996**, nagrodę otrzymała

prof. **Leokadia Kłyszajko-Stefanowicz** za podręcznik pt. „*Cytobiochemia*”, PWN, 1995,

a wyróżnienie prof. **Grzegorz Bartosz** za książkę pt. „*Druga twarz tlenu*”. PWN, 1995.

— W drugiej edycji konkursu (**1998**)

nagrodę za podręcznik pt. „*Nowe tendencje w biologii molekularnej i inżynierii genetycznej oraz w medycy-*

nie", praca zbiorowa, SORUS, Poznań, 1996, przyznano jego redaktorom: **Janowi Barciszewskiemu, Krzysztofowi Łastowskiemu i Tomaszowi Twardowskiemu**

W skład komisji konkursowej wchodził:

#### Przewodniczący:

1. Prof. Zofia Walter (1996, 1998) Łódź

#### Członkowie:

1. Prof. Tomasz Borkowski (1996, 1998) Lublin
2. Prof. Jerzy Chmielowski (1998) Katowice
3. Prof. Magdalena Fikus (1998) Warszawa
4. Prof. Leokadia Kłyszajko-Stefanowicz (1998) Łódź
5. Prof. Jerzy Popinigis (1996, 1998) Gdańsk
6. Prof. Zofia Poremska (1996) Warszawa
7. Prof. Zdzisław Żak (1996, 1998) Kraków

Od roku 1997 Zarząd Główny PTBioch przyznaje **nagrodę za najlepszą pracę z chemii i biochemii kwasów nukleinowych**, wykonaną głównie w Polsce. Inicjatorem nagrody jest Sekcja Kwasów Nukleinowych PTBioch kierowana przez prof. Jana Barciszewskiego, a sponsorem nagrody i okazałego dyplomu — Sigma-Aldrich Polska.

Kandydatów do nagrody wyłania Kapituła w składzie:

Jan Barciszewski (Poznań), Edward Darżynkiewicz (Warszawa), Witold Filipowicz (Basel), Ryszard Kole (Chapel Hill NC, USA), Maria M. Konarska (New York NY, USA), Jarosław Kuśmierek (Warszawa), Wojciech T. Markiewicz (Poznań), Antoni J. Rafalski (Wilmington DE, USA), Jacek Stawiński (Sztokholm), Wojciech J. Stec (Łódź), Leroy Townsend (Arbor MI, USA), Zygmunt Wasylewski (Kraków), Jolanta Zakrzewska-Czerwińska (Wrocław), Maciej Żylicz (Gdańsk)

W roku **1997**, w pierwszej edycji konkursu, nagrodę otrzymali:

**L. Woźniak, J. Pyzowski i W. J. Stec**, za pracę ot. „*New approach to the synthesis of oligo(nucleoside methanphosphonate)s*” opublikowaną w *Journal of Organic Chemistry* 61, 879-881, 1996;

— w roku **1998** przyznano dwie nagrody, otrzymali je:

1. **Prof. Maciej Wiewiórowski** za całokształt osiągnięć w badaniach kwasów nukleinowych (nagroda specjalna z okazji 80 rocznicy urodzin, wręczona podczas otwarcia międzynarodowej konferencji nt. „*Nucleic acids and their constituents chemical evolution undergoing biological evolution*”, w Poznaniu, 10 maja 1998)
2. **Mariusz Popenda, Ewa Biata, Jan Milecki, Ryszard W. Adamiak**, za pracę pt. „*Solution structure of RNA duplexes containing alternating CG base pairs: NMR study of r(CGCGCG)<sub>2</sub> and 2'-O-ME(CGCGCG)<sub>2</sub> under low salt conditions*”, opublikowaną w *Nucleic Acids Research* 22, 4589-4598, 1997.

Nagrody PTBioch stanowią nie tylko prestiżowe wyróżnienie, od trzech lat związana jest z nimi dość znaczna kwota.

## Konkurs na najlepiej przygotowany i wygłoszony wykład akademicki

Konkursy na najlepiej przygotowany i wygłoszony wykład z dziedziny nauk biologicznych, biochemii i biologii molekularnej mają na celu popularyzację osiągnięć nauk biologicznych. Odbываły się corocznie od 1993 do 1996 roku.

W roku **1996** dwie równorzędne nagrody uzyskali:

**Hanna Czeczot** za wykład pt. „Biochemia nasienia”

**Zygmunt Pojda** za wykład pt. „Cytokiny w regulacji i odpowiedzi układu krwiotwórczego”

W roku 1997 i 1998, z powodu braku zgłoszeń konkurs nie został przeprowadzony.

## Ważniejsze uchwały organów statutowych towarzystwa

1. Utworzenie Sekcji Kwasów Nukleinowych i powołanie prof. Jana Barciszewskiego na jej przewodniczącego;

2. Ustanowienie konkursu o nagrodę za najlepszą pracę z dziedziny chemii i biochemii kwasów nukleinowych, sponsorowaną przez Sigma-Aldrich-Polska oraz zatwierdzenie jej regulaminu i składu komisji konkursowej, a następnie Kapituły Nagrody;

3. Decyzja nawiązanie kontaktów z biochemikami lwowskich placówek naukowych, organizacja wspólnej polsko-ukraińskiej konferencji naukowo-wspomnieniowej poświęconej Jakubowi K. Parnasowi we Lwowie

oraz wykonania tablicy pamiątkowej ze składek biochemików polskich;

4. Decyzja o organizacji polsko-ukraińskich konferencji im. Jakuba K. Parnasa, co drugi rok, na przemian w Polsce i na Ukrainie oraz zatwierdzenie Oddziału Gdańskiego PTBioch jako organizatora „The 2nd Parnas Conference” w roku 1998;

5. Decyzje o organizacji Zjazdów PTBioch w roku 1997 (Katowice), 1998 (Białystok), 1999 (Olsztyn) i 2000 (Poznań);

6. Przeniesienie redakcji „*Postępow Biochemii*” do nowego pomieszczenia (p. 632) w małym budynku Instytutu Biologii Doświadczalnej PAN, im. M. Nenckiego przy ul. Pasteura 3, w Warszawie;

7. Decyzja o doprowadzeniu sieci Internetowej do siedziby Zarządu Głównego oraz redakcji „*Acta Biochimica Polonica*” i „*Postępow Biochemii*”;

8. Decyzja o stworzeniu internetowej strony www PTBiochu;

9. Decyzje o niewielkich koniecznych zmianach wysokości składek członkowskich;

10. Decyzje o przedstawieniu Walnemu Zebraniu Członków PTBioch poprawnych pod względem formalnym wniosków o nadanie godności członka honorowego (w kolejności zgłoszeń): prof. Mieczysławowi Chorążemu, prof. Jerzemu Chmielowskiemu, prof. Konstancji Raczyńskiej-Bojanowskiej i prof. Bronisławie Morawieckiej.

## **Działalność organizacyjno-naukowa towarzystwa**

### **1. Zjazdy Polskiego Towarzystwa Biochemicznego**

W bieżącej Kadencji odbyły się trzy Zjazdy PTBioch:

XXXII Zjazd w Krakowie 1996

XXXIII w Katowicach 1997

XXXIV w Białymstoku 1998

Spotkania te cieszyły się dużym zainteresowaniem, czego dowodem była wysoka frekwencja (600—800 osób), oraz liczba i różnorodność nadsyłanych komunikatów. Już od pewnego czasu w programach Zjazdu znajdują się sesje poświęcone biotechnologii, biochemii klinicznej oraz dydaktyce. Coraz liczniejszy jest również udział w Zjeździe osób nie będących członkami naszego Towarzystwa. Liczny jest również udział młodych kolegów-biochemików oraz studentów pracujących naukowo w Studenckich Kołach Naukowych.

### **2. Polsko-Ukraińskie Konferencje Biochemiczne im. Jakuba Karola Parnasa**

Pierwszą Konferencję zorganizował Zarząd Główny PTBioch we Lwowie, w dniach 8-11 września 1996 r. Przewodniczącą Komitetu Naukowo-Organizacyjnego była prof. Liliana Konarska ze strony polskiej i prof. Rostisław Stoika, ze strony ukraińskiej. Konferencja połączona była z wmurowaniem w budynku, w którym pracował Jakub K. Parnas, tablicy pamiątkowej, wykonanej w Polsce ze składki polskich biochemików. Obszerne sprawozdanie z tej Konferencji, w której wzięło udział 65 osób z Polski, zawiera specjalny zeszyt „*Postępow Biochemii*” 43 (5) 1997.

Drugą Konferencję (*The 2nd Parnas Conference*) zorganizował Oddział PTBioch w Gdańsku, w dniach 11-13 września 1998 r. Przewodniczącym Komitetu Naukowo-Organizacyjnego był prof. Stefan Angielski, ze strony polskiej i prof. Rostisław Stoika, ze strony ukraińskiej. Obrady odbywały się w Dworze Artusa i miały wyjątkowo uroczystą oprawę i wysoki poziom naukowy. Konferencja została włączona w program III Dni Kultury Ukraińskiej w Polsce. W tym drugim polsko-ukraińskim spotkaniu naukowym wzięło udział ok. 70 osób z Polski, 40 z Ukrainy (z Kijowa, Lwowa i Charkowa), a także z Litwy i Łotwy. Zaproszeni byli wykładowcy ze Szwajcarii, Włoch, Szwecji, Norwegii, Austrii i USA.

### **3. Monotematyczne sesje naukowe**

W XV kadencji odbyło się kilkadziesiąt mini-sympozjów i konferencji naukowych zorganizowanych poprzez sekcje tematyczne i Oddziały terenowe.

### **4. Spotkania wykładowców biochemii i biochemii klinicznej**

Coroczne spotkania kierowników Zakładów Biochemii Akademii Medycznych z terenu Polski w bieżącej Kadencji odbyły się:

— w Rokitnicy (1966) — organizowane przez prof. Romana Tarnawskiego

— w Lublinie (1997) — organizowane przez prof. Marię Stryjecką-Zimmer i prof. Tomasza Borkowskiego

— w Łodzi (1998) — organizowane przez prof. Janusza Gregera

Tematem Konferencji były programy nauczania biochemii i biologii molekularnej w uczelniach medycznych w Polsce i w Europie.

## Staże naukowe

Staże naukowe są gorąco popierane przez Zarząd Główny Polskiego Towarzystwa Biochemicznego. Członkowie naszego Towarzystwa brali udział w wielu krajowych i zagranicznych Zjazdach, Sympozjach, kilku miesięcznych lub rocznych pobytach naukowych w placówkach zagranicznych. Współpraca z FEBS rozwija się pomyślnie. Każdego roku ze stypendiów FEBS korzystało 12-15 osób (Tabela 5).

**Tabela 5.**

Liczba członków Polskiego Towarzystwa Biochemicznego korzystających z kursów i stypendiów FEBS w latach 1995-1997

		1995	1996	1997
1	Advanced courses and youth travel found	9	11	12
2	Short-term fellowships	3	2	1
3	Summer fellowships	—	—	—
4	Long-term fellowships	—	2	1
	● ŁĄCZNIE	12	15	14

## Przynależność do Organizacji Międzynarodowych

1. Polskie Towarzystwo Biochemiczne od roku 1963 jest członkiem Europejskiej Federacji Towarzystw Biochemicznych (FEBS). W roku 1995, po wielu latach przerwy, przedstawiciel PTBioch — prof. Maciej J. Nałęcz został wybrany do władz FEBSu i jest członkiem Advanced Courses Committee (kadencja do 1999 r.).
2. W roku 1995 Sekcja Biotechnologii Polskiego Towarzystwa Biochemicznego została przyjęta w poczet Członków Europejskiej Federacji Biotechnologii.
3. Sekcja Bioenergetyczna PTBioch należy do Międzynarodowej Grupy Bioenergetycznej (IUBMB/IUPAB).

## Ogólna ocena pracy w XV Kadencji

Miniona, XV Kadencja władz Polskiego Towarzystwa Biochemicznego przebiegała pomyślnie. Odkonano wiele interesujących imprez naukowych, dydaktycznych, uzyskano niezaprzeczalne sukcesy wydawnicze. Niewątpliwym osiągnięciem było wyposażenie biura Zarządu Głównego oraz redakcji „Postępów Biochemii”, „Acta Biochimica Polonica” i Monografii „Biochemicznych” w ich nowej siedzibie na terenie Instytutu Biologii Doświadczalnej PAN im. M. Nenckiego, w sprzęt elektroniczny i odpowiednie oprogramowanie. Niewątpliwym osiągnięciem było przyjęcie przedstawiciela naszego Towarzystwa do władz FEBS oraz Sekcji Biotechnologii Polskiego Towarzystwa Biochemicznego do Europejskiej Federacji Biotechnologii.

Wszystkie te zmiany prowadzą do większej integracji naszego biochemicznego środowiska. Dzięki entuzjazmowi i zaangażowaniu naszych koleżanek i kolegów w prawdziwie bezinteresowną pracę społeczną udało się zrealizować wiele inicjatyw i akcji na rzecz rozwoju naszej dyscypliny, co jest Statutowym celem Polskiego Towarzystwa Biochemicznego.

Członkom Zarządu Głównego oraz wszystkim tym, którzy poświęcili swój czas i energię włączając się w działalność Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, a w szczególności organizatorom naszych zjazdów, sympozjów i konferencji, przewodniczącym Oddziałów i Sekcji Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, członkom wszystkich Komisji Konkursowych w minionej kadencji, serdecznie dziękuję za wspólną pracę i satysfakcję z wielu owocnych inicjatyw na rzecz naszego środowiska naukowego.

*Prezes Zarządu Głównego  
XIV Kadencji  
prof. dr hab. Liliana Konarska*

Białystok, 16 września 1998 r.

# Protokół z XVI Walnego Zebrania Członków Polskiego Towarzystwa Biochemicznego

Walne Zebranie członków Polskiego Towarzystwa Biochemicznego zostało zaplanowane przez Zarząd Główny PTBioch. na dzień 16 września 1998 roku o godz. 15:00 w pierwszym terminie lub o godz. 15:15 w drugim terminie, w sali wykładowej Collegium Universum Akademii Medycznej w Białymstoku, podczas XXXIV Zjazdu PTBioch. 14 sierpnia 1998 roku. Zarząd Główny przesłał członkom PTBioch, uprawnionym do głosowania, zaproszenie do udziału w Walnym Zebraniu oraz jego program (w załączeniu). Zaproszenie to stanowiło kartę wstępu na Zebranie oraz mandat wyborczy na podstawie którego, członkom Towarzystwa wydano przy wejściu na salę karty do głosowania.

Walne Zebranie rozpoczęło się w drugim terminie o godz. 15:15, bowiem w pierwszym terminie o godz. 15:00 nie uzyskano quorum. Zgodnie ze statutem Towarzystwa uchwały podjęte w drugim terminie są prawomocne bez względu na liczbę obecnych.

W zebraniu uczestniczyło 109 członków Towarzystwa uprawnionych do głosowania. Na wstępie Przewodniczący Oddziału PTBioch w Białymstoku, dr hab. Jerzy Pałka zaproponował w imieniu Zarządu Głównego oraz Oddziałów: Lubelskiego, Olsztyńskiego i Białostockiego PTBioch. powołanie Prof. Tomasza Borkowskiego na Przewodniczącego Walnego Zebrania. Kandydat wyraził zgodę. Przewodniczącym Zebrania wybrano jednogłośnie w wyborach jawnych Prof. Tomasza Borkowskiego (AM Lublin) a sekretarzem dr Elżbietę Pawlicką (AM Białystok).

Prof. Tomasz Borkowski zaproponował kandydatury Zarządu Głównego oraz przyjął kandydatury z sali do Komisji Matki, Komisji Skrutacyjnej i Komisji Wniosków. W głosowaniu jawnym wybrano jednogłośnie Komisje w następującym składzie:

Komisja Matka	Prof. Janina Kwiatkowska, Prof. Zofia Walter, Prof. Roman Tarnawski
Komisja Skrutacyjna	Przewodniczący: Prof. Krystyna Olczyk Członkowie: Dr Bolesław Floriańczyk, Dr Marzanna Cechowska-Pasko, Dr Puchalska
Komisja Wniosków	Prof. Barbara Grzelakowska-Sztabert, Prof. Janusz Greger, Dr Teresa Wesołowska, mgr Justyna Steinbrich

Przystąpiono do realizacji 4 punktu porządku dziennego zebrania. Przyjęto protokół z poprzedniego XV Walnego Zebrania w dniu 7 września 1995 roku. Wyciąg z tego protokołu został zamieszczony w *Postęпах Biochemii*, 1996, 42(1), 96. Następnie wysłuchano sprawozdania ustępującego Prezesa PTBioch prof. Liliany Konarskiej z działalności ustępującego Zarządu oraz sprawozdania Przewodniczącej Komisji Rewizyjnej prof. Marty Stryjeckiej-Zimmer. Prof. Liliana Konarska przypomniała zebrany, że w bieżącym roku obchodzimy 40-lecie istnienia Towarzystwa. Powstało ono 12 grudnia 1958 roku. Obecnie Towarzystwo liczy 1778 członków. Poruszyła sprawę nieopłacania składek członkowskich. Z tego powodu zawieszono w prawach członkowskich 658 osób. W minionej kadencji Zarząd Główny przyczynił się do dalszego rozwoju Towarzystwa poprzez założenie strony internetowej, zdobycie środków finansowych (KBN, sponsorzy indywidualni) na wydanie czasopism i nagrody statutowe oraz promocje młodych talentów biochemicznych. Ponadto Zarząd Główny zorganizował polsko-ukraińskie spotkanie biochemików poświęcone pamięci prof. Jakuba Parnasa. W 1996 roku ustanowił nagrodę im. Antoniego Dmochowskiego w postaci medalu pamiątkowego i dyplomu, a w 1997 roku nagrodę za najlepszą pracę w dziedzinie kwasów nukleinowych.

W sprawozdaniu Komisji Rewizyjnej prof. Marta Stryjecka-Zimmer zwróciła uwagę, że w latach 1995—1998 liczba członków Towarzystwa wzrosła o 178 osób. Gospodarka zasobami finansowymi i księga finansowa prowadzone były prawidłowo. Teksty sprawozdań zostaną zamieszczone w najbliższym numerze „*Postępow Biochemii*”.

Udzielono absolutorium ustępującemu Zarządowi i przeprowadzono wybory nowych władz Towarzystwa.

Przewodnicząca Komisji Matki, prof. Janina Kwiatkowska poprosiła o zgłaszanie kandydatur do funkcji Prezesa Polskiego Towarzystwa Biochemicznego. Prof. Mariusz Żydowo zgłosił kandydaturę Prof. Edwarda Bańkowskiego motywując swoją propozycję wieloma zaletami kandydata: umiejętnościami organizacyjnymi, wybitnymi zasługami naukowymi, wrażliwością społeczną. Pan Prof. Edward Bańkowski odmówił motywu-



jąc swoją rezygnację olbrzymią liczbą funkcji jakie pełni w rodzimej Uczelni i w Towarzystwach międzynarodowych. Następnie Pan Prof. Kazimierz Zakrzewski prosił Prof. Edwarda Bańkowskiego o wycofanie odmowy. Prof. Edward Bańkowski ponownie odmówił przyjęcia kandydatury na funkcję Prezesa PTBioch. Motywował swoją decyzję lojalnością wobec decyzji Zarządu Głównego (w skład którego wchodzi) zgłaszającego inną kandydaturę.

Zarząd Główny zgłosił kandydaturę **prof. Jolanty Barańskiej** do funkcji Prezesa PTBioch, a prof. Mariusz Żydowo zgłosił kandydaturę **prof. Liliany Konarskiej** do funkcji wiceprezesa PTBioch. Innych zgłoszeń z sali nie było. Następnie przystąpiono do przyjmowania zgłoszeń kandydatów do Komisji Rewizyjnej i na członków Zarządu. Wpłynęły następujące propozycje Zarządu Głównego do Komisji Rewizyjnej:

Prof. Marta Stryjecka-Zimmer (Lublin)  
Prof. Barbara Grzelakowska-Sztabert (Warszawa)  
Prof. Jerzy Popinigis (Gdańsk)

Propozycji z sali nie było.

W dalszej kolejności wpływały z sali następujące kandydatury na członka Zarządu Głównego:

Dr Teresa Wesołowska (Szczecin)  
Prof. Roman Tarnawski (Katowice)  
Prof. Edward Bańkowski (Białystok)  
Dr hab. Piotr Laidler (Kraków)  
Dr Ewa Turska (Łódź)  
Dr hab. Kazimierz Pasternak (Lublin)  
Dr hab. Henryk Berbeć (Lublin)  
Prof. Stanisław Bielecki (Łódź)  
Prof. Aleksandra Kubicz (Wrocław)  
Prof. Teresa Jakubowicz (Lublin)  
Dr hab. Michał Woźniak (Gdańsk)  
Dr hab. Jan Głogowski (Olsztyn)  
Prof. Lech Wojtczak (Warszawa)  
Prof. D. Stempkowski (Warszawa)  
Prof. Julian Świerczyński (Gdańsk)  
Dr hab. Małgorzata Balińska (Warszawa)  
Prof. Janusz Siedlecki (Warszawa)  
Dr hab. Robert Stępkowski (Warszawa)  
Dr Artur Jarmołowski (Poznań)

W tajnym głosowaniu wybrano Prezesa, Wiceprezesa, Członków Zarządu i Komisję Rewizyjną Zarządu Głównego Polskiego Towarzystwa Biochemicznego:

<b>Prezes:</b>	<b>Prof. Jolanta Barańska</b>	— 100 głosów
<b>Wiceprezes:</b>	<b>Prof. Liliana Konarska</b>	— 99 głosów
<b>Komisja Rewizyjna</b>	Prof. Marta Stryjecka-Zimmer	— 105 głosów
	Prof. Barbara-Grzelakowska-Sztabert	— 102 głosy
	Prof. Jerzy Popinigis	— 95 głosów
<b>Członkowie Zarządu:</b>	Dr Teresa Wesołowska	— 105 głosów
	Prof. Roman Tarnawski	— 95 głosów
	Prof. Edward Bańkowski	— 94 głosy
	Dr hab. Piotr Laidler	— 94 głosy
	Dr Ewa Turska	— 88 głosów
	Prof. Stanisław Bielecki	— 83 głosy
	Prof. Aleksandra Kubicz	— 83 głosy
	Prof. Teresa Jakubowicz	— 82 głosy
	Dr hab. Michał Woźniak	— 79 głosów
	Dr hab. Jan Głogowski	— 78 głosów
	Prof. Lech Wojtczak	— 77 głosów
	Prof. Julian Świerczyński	— 74 głosy
	Dr hab. Robert Stępkowski	— 4 głosy
Dr Artur Jarmołowski	— 70 głosów	

Następnie przystąpiono do regulaminowych procedur nadania godności członka honorowego Polskiego Towarzystwa Biochemicznego następującym Profesorom:

1. Prof. Konstancji Raczyńskiej-Bojanowskiej
2. Prof. Bronisławie Morawieckiej
3. Prof. Mieczysławowi Chorążemu
4. Prof. Jerzemu Chmielowskiemu

Laudacje wygłosili odpowiednio:

Prof. Barbara Grzelakowska-Sztabert (Warszawa)

Prof. Maria Malicka-Błaszkiwicz (Wrocław)

Prof. Roman Tarnawski (Katowice)

Prof. Sylwia Łabużek (Katowice)

Pełne teksty „laudacji” w załączeniu.

W wyborach tajnych nadano większością głosów Członka Honorowego Polskiego Towarzystwa Biochemicznego następującym Profesorom:

- |  |             |
|--|-------------|
| 1. Prof. Konstancji Raczyńskiej-Bojanowskiej (IHiAR, Błonie)   | — 94 głosy  |
| 2. Prof. Bronisławie Morawieckiej (Uniwersytet Wrocławski)     | — 93 głosy  |
| 3. Prof. Mieczysławowi Chorążemu (Instytut Onkologii Gliwice)  | — 97 głosów |
| 4. Prof. Jerzemu Chmielowskiemu (Uniwersytet Śląski, Katowice) | — 93 głosy  |

W dalszej części spotkania, zgodnie z porządkiem dziennym zebrania dyskutowano na temat dotychczasowej i przyszłej działalności Towarzystwa i zgłaszano wnioski.

W dyskusji poruszono sprawy wysokości składek członkowskich, opłaty za prenumeratę wydawnictw Towarzystwa, regulaminu konkursu nagród i statutu Towarzystwa. Ustalono wysokość opłaty członkowskiej dla członków zwyczajnych Towarzystwa w kwocie 30 zł a dla członków studentów w kwocie 10 zł. Podobnie przegłosowano wysokość opłaty za prenumeratę „Postępów Biochemii” w kwocie 20 zł i inne wydawnictwa Towarzystwa w kwocie 40 zł.

Pani Dr Teresa Wesołowska zgłosiła wniosek o uregulowanie statusu członkostwa Towarzystwa poprzez wyszczególnienie kategorii członka PTBioch:

- członka zwyczajnego
- członka studenta
- członka emeryta
- członka honorowego
- członka wspierającego

Ponadto wystąpiono z wnioskiem, aby wybory odbywały się we wrześniu, a początek urzędowania nowego Zarządu nastąpił od nowego roku kalendarzowego. Pozwoliłoby to ustępującemu Zarządowi na rozliczenie się z działalności finansowej w danym roku kalendarzowym. Wniosek został poparty sugestią, aby dokonać zapisu w Statucie Towarzystwa, że kadencja władz trwa trzy lata, licząc od nowego roku kalendarzowego. Decyzją Walnego Zebrania postanowiono powołać Komisję Statutową, która opracuje zmiany w Statucie zgodnie z wnioskami członków Towarzystwa.

Sekretarz Walnego Zebrania  
*dr Elżbieta Pawlicka*

Przewodniczący Walnego Zebrania  
*prof. dr hab. Tomasz Borkowski*

Białystok, 16 września 1998

Redakcja informuje P. T. Autorów o możliwości zamieszczenia w artykułach barwnych rycin. Jednakże wobec wysokich cen ich reprodukcji koszty wykonania ponoszą autorzy.

# Informacja o XXXV Zjeździe Polskiego Towarzystwa Biochemicznego

XXXV Zjazd PTBioch odbędzie się w Olsztynie w dniach 13—16 września 1999 roku. Zjazd organizują członkowie Oddziału Olsztyńskiego pracujący w trzech Instytucjach Naukowych: Instytucie Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności Polskiej Akademii Nauk (IRZiBŻ), Wyższej Szkole Pedagogicznej (WSP) oraz Akademii Rolniczo-Technicznej (ART).

Powołany Komitet Organizacyjny Zjazdu ukonstytuował się w następującym składzie:

prof. dr hab. Jan Głogowski (IRZiBŻ)	— przewodniczący
prof. dr hab. Elżbieta Kostyra (WSP)	— w-ce przewodnicząca
dr Maria Młot (WSP)	— sekretarz
prof. zw. dr hab. Jerzy Strzeżek (ART)	— przewodniczący Komitetu Naukowego
prof. dr hab. Henryk Kostyra (IRZiBŻ)	— w-ce przewodniczący Komitetu Naukowego
prof. dr hab. Krystyna Żółtkowska (WSP)	— członek
dr hab. Zofia Luberda-Bieńkowska (ART)	— członek
dr Władysław Kordan (ART)	— członek
dr Dariusz Hołody (ART)	— członek

Powołano także Komitet Zjazdu w skład którego wchodzi: wojewoda olsztyński, prezydent Olsztyna oraz Rektorzy wyższych uczelni i Dyrektorzy placówek naukowych, mających swoje siedziby na terenie Olsztyna.

Obrady Zjazdu odbywać się będą na terenie Olsztyna-Kortowa, w obiektach Akademii Rolniczo-Technicznej. W domach akademickich, zlokalizowanych na terenie kampusu tej Uczelni istnieje możliwość zalwaterowania wszystkich Uczestników a w stplówce akademickiej możliwość wyżywienia.

Prof. Jerzy Strzeżek, przewodniczący Komitetu Naukowego, zwrócił się z pismem do wszystkich Oddziałów naszego Towarzystwa o zgłaszanie propozycji Sesji Tematycznych. W ramach Zjazdu przewidziane jest spotkanie towarzyskie oraz organizacja wycieczek po atrakcyjnych terenach Warmii i Mazur.

**Acta  
Biochimica  
Polonica**

Uprzejmie informujemy, że pismo *Acta Biochimica Polonica* jest indeksowane przez Current Contents (ISI, USA) Biochemistry & Biophysics Citation Index (ISI, USA), BIOSIS (USA), Chemical Abstract (Columbus, USA), Current Awareness in Biological Sciences (England), Excerpta Medica (Elsevier, Holland), Medline (USA).

## **BioCentrum** *Kraków*

### *Badawcze Laboratoria Usługowe Uniwersytetu Jagiellońskiego*

#### **Szanowni Państwo,**

Wychodząc naprzeciw potrzebom krajowego środowiska naukowego oraz biorąc pod uwagę konieczność pełniejszego wykorzystania posiadanej nowoczesnej aparatury badawczej Uniwersytet Jagielloński utworzył BioCentrum-Kraków. Jednostka ta skupia obecnie sześć laboratoriów badawczych Instytutu Biologii Molekularnej oraz Wydziału Chemii UJ, które podjęły się pełnić funkcje usługowe oraz szeroko pojęte doradztwo metodyczno-naukowe w zakresie nauk biomolekularnych obejmujących biochemię, biologię i chemię strukturalną, biologię komórki i genetykę molekularną. Analiza białek i kwasów nukleinowych stanowi serce nowoczesnych badań biomolekularnych i dlatego jest szeroko reprezentowana w naszej ofercie.

#### **Oferujemy nasze usługi w zakresie:**

- **chemii białek** (wysokoczułe sekwencjonowanie, analiza aminokwasowa oraz wysokorozdzielcza spektrometria masowa białek i peptydów, elektroforeza i elektroblot białek do sekwencjonowania, przygotowanie map peptydowych na HPLC)
- **biochemii kwasów nukleinowych** (synteza i sekwencjonowanie DNA)
- **technik inżynierii genetycznej** (konstrukcje i izolacja plazmidów, przygotowanie map restrykcyjnych, ekspresja genów, izolacja RNA i DNA, analiza Southern and Northern blot)
- **cytometrii przepływowej**
- **mikroskopii konfokalnej**

Ponadto posiadamy w sprzedaży preparaty wysokooczyszczonych proteinaz i ich białkowych inhibitorów.

**Szczegółowe informacje znajdziecie Państwo w Internecie na stronach Instytutu Biologii Molekularnej UJ <http://www.mol.uj.edu.pl> lub udzieli ich:**

Doc. dr hab. Adam Dubin, BioCentrum Kraków, Instytut Biologii Molekularnej UJ, Al. Mickiewicza 3, 31-120 Kraków

**e-mail:** [dubin@mol.uj.edu.pl](mailto:dubin@mol.uj.edu.pl); **Fax:** (+12)633-6907; **Tel:** (+12)634-13-05 wew. 219

*Nasze przedsięwzięcie nie jest nastawione na zysk, ale na zapewnienie ciągłej gotowości do pracy posiadanych nowoczesnych przyrządów badawczych — dlatego też nasze ceny są konkurencyjne.*

# Roczny spis treści tom 44, nr 1, 2, 3, 4, 1998

## ARTYKUŁY

- Lech Wojtczak** — Nagroda Nobla z chemii za 1997 rok — mitochondrialna syntaza ATP . . . 2
- Irena Kłodos** — Nagroda Nobla dla Jensa Christiana Skou za odkrycie ATPazy  $\text{Na}^+$  i  $\text{K}^+$  6
- Barbara Grzelakowska-Sztabert** — Molekularne mechanizmy apoptozy indukowanej poprzez aktywację błonowych receptorów z nadrodziny TNF-R . . . . . 8
- Grzegorz Bartosz** — Rola aktywnych form tlenu w apoptozie . . . . . 22
- Krystyna I. Wolska** — Antyterminacja transkrypcji u bakterii i bakteriofagów . . . . . 32
- Jacek Jaworski** — Kontrolowana ekspresja egzogennych genów w komórkach ssaków . 40
- Dobrawa Napierała, Ryszard Słomski** — Regulacja genu DMD człowieka. Przykład wielokrotnego wykorzystania informacji genetycznej . . . . . 48
- Andrzej Sobkiewicz, Ryszard Twardowski** — Wykorzystanie strategii antysensownych oligonukleotydów w badaniach ekspozycji i lokalizacji rRNA na powierzchni podjednostek rybosomalnych . . . . . 55
- Rafał Bobiński, Krystyna Olczyk, Ewa Krzyżanowska-Bobińska** — Małe proteoglikany śródmiąższowe — genetyczne różnice i podobieństwa 64
- Anna Jakubowska, Stanisław Kowalczyk** — Biochemiczne i molekularne podstawy symbiotycznych oddziaływań bakterii i roślin . . . . . 72
- Andrzej Kostyrko, Wiesław H. Trzeciak** — Mechanizmy redagowania jądrowych mRNA . . . . . 94
- Joanna Pieńkowska, Zofia Szweykowska-Kulińska** — Małe jądrowe RNA . . . 102
- Andrzej Tretyn** — Fitichromopodobne systemy fotorecepcji u sinic . . . . . 113
- Edyta Gendaszewska** — Szczepionki DNA. 117
- Maria Koziółkiewicz** — Strategia antysensownych oligonukleotydów — nowe trendy . 125
- Grzegorz Bartosz** — Transportery ABC w komórkach człowieka . . . . . 136
- Łukasz Pułaski** — Krypty; zapomniane organelle ponownie odkryte . . . . . 151
- Ludmiła Żylińska, Elżbieta Rębas, Agnieszka Lachowicz, Lilla Lachowicz** — Białka G — najważniejsze sygnalizatory komórkowe? 158
- Agnieszka Lachowicz, Lilla Lachowicz, Ludmiła Żylińska, Elżbieta Rębas** — Funkcja sygnalizacyjna białek G niewrażliwych na PTX w komórce . . . . . 164
- Katarzyna Lisowska, Zbigniew Krawczyk** — Rodzina genów stresu *hsp 70* ssaków 179
- Cezary Żekanowski, Hanna Skopczyńska** — Molekularne podłoże przewlekłej choroby ziarniniakowej . . . . . 193
- Jolanta Barańska** — Przekazywanie sygnałów w komórce roślinnej; receptory błony komórkowej . . . . . 201
- Iwo Bohr, Jadwiga Gniot-Szulżycka** — CD45, antygen z aktywnością fosfatazową, budowa, działanie i rola w aktywacji limfocytów T . . . . . 208
- Krystyna Dzierzbicka, Magdalena Gozdowska, Aleksander M. Kołodziejczyk** — Wpływ immunomodulatorów typu MDP na sekrecję i aktywność cytokin . . . . . 216
- Dariusz Kmiecik** — Wirus vaccinia i jego zastosowanie w biologii molekularnej . . . . 220
- Magdalena Dąbrowska** — Regulacja ekspresji genu syntazy tymidylanowej . . . . . 228
- Joanna Bandorowicz-Pikuła, Sławomir Pikuła** — W jaki sposób aneksyny, rozpuszczalne białka wiążące wapń, tworzą w błonie kanały jonowe? . . . . . 237

<b>Rafał Bobiński, Krystyna Olczyk, Ewa Krzyżanowska-Bobińska</b> — Proteoglikany agregujące z kwasem hialuronowym . . . . .	245	<b>Anna Dygas</b> — Fosfatydyloseryna u Prokaryota i Eukaryota. Dekarboksylacja, synteza i transport . . . . .	292
<b>Piotr Widłak</b> — Apoptoza: nukleaza, kaspazy, cytochrom c . . . . .	252	<b>Marek Langer</b> — Liposomowe nośniki materiału genetycznego . . . . .	299
<b>Jan Zimowski</b> — Glikoalkaloidy steroidowe z rodziny <i>Solanaceae</i> . . . . .	254	<b>Agnieszka Krakowiak, Maria Koziółkiewicz</b> — Oligonukleotydy o właściwościach aptamerycznych . . . . .	306
<b>Marta Bobeszko, Jolanta Barańska</b> — Nowe w biochemii: udział endosomu w transmisji sygnału insulinowego . . . . .	263	<b>Magdalena Krzymowska</b> — Roślinne geny odporności i ich rola podczas infekcji . . . . .	318
<b>Anna Kiersztan</b> — Insulinopodobne działanie związków wanadu . . . . .	275	<b>Irena Siegień</b> — Cyjanogeneza u roślin . . . . .	325
<b>Jerzy Bełtowski</b> — Mechanizmy regulacji Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> — ATPazy w nabłonku kanalików nerkowych . . . . .	282	<b>Ewa Laskowska, Alina Taylor</b> — Rola proteaz szoku termicznego w usuwaniu zdenaturowanych białek z komórek <i>E. coli</i> . . . . .	334
		<b>Agnieszka Sirko</b> — Białko IHF jako regulator metabolizmu <i>Escherichia coli</i> . . . . .	345

## INNE

Sprawozdania . . . . .	83, 267, 355
Informacje o książkach . . . . .	170, 267
Informacje różne . . . . .	269, 366, 369

## Indeks autorów prac przeglądowych, tom 44, 1998

### B

- Bandorowicz-Pikuła J** — Pracownia Biochemii Lipidów, Zakład Biochemii Komórki, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN, Pasteura 3, 02-093 Warszawa
- Barańska J** — Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN, Zakład Neurobiologii Molekularnej i Komórkowej, ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa
- Bartosz G** — Katedra Biofizyki Molekularnej Uniwersytetu Łódzkiego, ul. Banacha 12/16, 90-237 Łódź
- Bełtowski J** — Katedra i Zakład Patofizjologii Akademii Medycznej, ul. Jaczewskiego 8, 20-090 Lublin
- Bobeszko M** — Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN, Zakład Neurobiologii Molekularnej i Komórkowej, ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa
- Bohr I** — Zakład Biochemii, Instytut Biologii Ogólnej i Molekularnej, Wydział Biologii i Nauk o Ziemi, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu, ul. Gagarina 7, 87-100 Toruń
- Bobiński R** — Katedra i Zakład Chemii Klinicznej i Diagnostyki Laboratoryjnej, Śląska Akademia Medyczna, ul. Jagiellońska 4, 41-200 Sosnowiec

### D

- Dąbrowska M** — Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN, Zakład Biochemii Komórki, ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa
- Dygas A** — Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN, Zakład Neurobiologii Molekularnej i Komórkowej, ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa
- Dzierzbicka K** — Katedra Chemii Organicznej, Politechnika Gdańska, ul. Narutowicza 11/12, 80-952 Gdańsk

### G

- Gendaszewska E** — Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych, Zakład Chemii Bioorganicznej, ul. Sienkiewicza 112, 90-363 Łódź
- Gniot-Szulżycka J** — Zakład Biochemii, Instytut Biologii Ogólnej i Molekularnej, Wydział Biologii i Nauk o Ziemi, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu, ul. Gagarina 7, 87-100 Toruń
- Gozdowska M** — Katedra Chemii Organicznej, Politechnika Gdańska, ul. Narutowicza 11/12, 80-952 Gdańsk

**Grzelakowska-Sztabert B** — Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN, ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa

## J

**Jakubowska A** — Zakład Biochemii, Instytut Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Mikołaja Kopernika, ul. Gagarina 9, 87-100 Toruń

**Jaworski J** — Pracownia Neurobiologii Molekularnej, Zakład Neurobiologii Molekularnej i Komórkowej, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego, PAN, ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa

## K

**Kiersztan A** — Zakład Regulacji Metabolizmu, Instytut Biochemii, Uniwersytet Warszawski, ul. Żwirki i Wigury 93, 02-089 Warszawa

**Kłodos I** — Dept. of Biophysics, University of Aarhus, Ole Worms Alle 185, DK-8000 Aarhus C., Denmark

**Kmieciak D** — Katedra i Zakład Chemii Fizjologicznej, Akademia Medyczna im. K. Marcinkowskiego, ul. Święcickiego 6, 60-781 Poznań

**Kołodziejczyk AM** — Katedra Chemii Organicznej, Politechnika Gdańska, ul. Narutowicza 11/12, 80-952 Gdańsk

**Kostyrko A** — Katedra i Zakład Chemii Fizjologicznej A.M. im. Karola Marcinkowskiego, ul. Święcickiego 6, 60-781 Poznań

**Kowalczyk S** — Michigan State University, Department of Botany and Plant Pathology, East Lansing, MI 48824. USA

**Koziołkiewicz M** — Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych, Zakład Chemii Bioorganicznej PAN, ul. Sienkiewicza 112, 90-363 Łódź

**Krakowiak A** — Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych, Zakład Chemii Bioorganicznej PAN, ul. Sienkiewicza 112, 90-363 Łódź

**Krawczyk Z** — Zakład Biologii Molekularnej, Centrum Onkologii — Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie, ul. Wybrzeże AK 15, 44-100 Gliwice

**Krzymowska M** — Instytut Biochemii i Biofizyki PAN, ul. Pawińskiego 5a, 02-106 Warszawa

**Krzyżanowska-Bobińska E** — Samodzielna Pracownia Mikrobiologii, Szpital Górniczy, 41-200 Sosnowiec

## L

**Lachowicz A** — Instytut Endokrynologii Akademii Medycznej, ul. Sterlinga 3, 91-425 Łódź

**Lachowicz L** — II Zakład Biochemii Instytutu Fizjologii i Biochemii Akademii Medycznej, ul. Lindleya 6, 90-131 Łódź

**Langner M** — Katedra Fizyki i Biofizyki, Akademia Rolnicza, ul. Norwida 25, 50-375 Wrocław

**Laskowska E** — Katedra Biochemii, Pracownia Biochemii Bakteryjnej, Uniwersytet Gdański, ul. Kładki 24, 80-822 Gdańsk

**Lisowska K** — Zakład Biologii Molekularnej, Centrum Onkologii — Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie, ul. Wybrzeże AK 15, 44-100 Gliwice

## N

**Napierała D** — Zakład Genetyki Człowieka PAN, ul. Strzeszyńska 32, 60-479 Poznań

## O

**Olczyk K** — Katedra i Zakład Chemii Klinicznej i Diagnostyki Laboratoryjnej, Śląska Akademia Medyczna, ul. Jagiellońska 4, 41-200 Sosnowiec

## P

**Pieńkowska J** — Zakład Ekspresji Genów, UAM, ul. Międzychodzka 5, 60-371 Poznań

**Pikuła S** — Pracownia Biochemii Lipidów, Zakład Biochemii Komórki, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN, ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa

**Pułaski Ł** — Katedra Biofizyki Molekularnej Uniwersytetu Łódzkiego, ul. Banacha 12/16, 90-237 Łódź

## R

**Rębas E** — II Zakład Biochemii Instytutu Fizjologii i Biochemii Akademii Medycznej, ul. Lindleya 6, 90-131 Łódź

## T

**Trzeciak WH** — Katedra i Zakład Chemii Fizjologicznej A.M. im. Karola Marcinkowskiego, ul. Święcickiego 6, 60-781 Poznań

**Tretyn A** — Uniwersytet M. Kopernika, Instytut Biologii Ogólnej i Molekularnej, Zakład Fizjologii i Morfogenezы Roślin, Gagarina 9, 87-100 Toruń oraz Akademia Rolniczo-Techniczna im. A. Oczapowskiego, Zakład Biologii Komórki, Kortowo, 10-718 Olsztyn

## S

**Siegień I** — Zakład Botaniki i Fizjologii Roślin, Instytut Biologii, Uniwersytet w Białymstoku, ul. Świerżkowska 20B, 15-950 Białystok

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

**Skopczyńska H** — Klinika Immunologii Instytutu „Pomnik Centrum Zdrowia Dziecka”, Al. Dzieci Polskich 20, 04-736 Warszawa

**Słomski R** — Zakład Genetyki Człowieka PAN, ul. Strzeszyńska 32, 60-479 Poznań

**Sobkiewicz A** — Instytut Chemii Bioorganicznej PAN, ul. Noskowskiego 12/14, 61-704 Poznań

**Szweykowska-Kulińska Z** — Katedra i Zakład Chemii Fizjologicznej A.M. im. Karola Marcinkowskiego, ul. Święcickiego 6, 60-781 Poznań

## T

**Taylor A** — Katedra Biochemii, Pracownia Biochemii Bakteryjnej, Uniwersytet Gdański, ul. Kładki 24, 80-822 Gdańsk

**Twardowski T** — Instytut Chemii Bioorganicznej PAN, ul. Noskowskiego 12/14, 61-704 Poznań

## W

**Widlak P** — Zakład Radiobiologii Doświadczalnej i Klinicznej, Instytut Onkologii, Oddział w Gliwicach, ul. Wybrzeże AK 15, 44-100 Gliwice

**Wojtczak L** — Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego, PAN, ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa

**Wolska K. I** — Zakład Genetyki Bakterii, Instytut Mikrobiologii, Uniwersytet Warszawski, ul. Nowy Świat 67, 00-046 Warszawa

## **Z**

**Zimowski J** — Instytut Biochemii, Uniwersytet Warszawski, ul. Żwirki i Wigury 93, 02-089 Warszawa

## **Ż**

**Żekanowski C** — Zakład Genetyki Instytutu Matki i Dziecka, ul. Kasprzaka 17a, 01-211 Warszawa

**Żylińska L** — II Zakład Biochemii Instytutu Fizjologii i Biochemii Akademii Medycznej, ul. Lindleya 6, 90-131 Łódź

**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 822 53 42  
e-mail [ptbioch@nencki.gov.pl](mailto:ptbioch@nencki.gov.pl)**

**Dyżury biura Zarządu odbywają się jak dotychczas  
we wtorki w godz. 12-18**





**Pokwitowanie dla wpłacającego**

zł .....

**słownie** .....

wpłacający .....

imię, nazwisko, dokładny adres z kodem pocztowym  
na rachunek

Polskie Towarzystwo Biochemiczne  
02-093 Warszawa, ul. Pasteura 3  
PBK S.A. XIII/O Warszawa  
11101053-1225-2720-3-30

stempel

Pobrano opłatę  
zł .....

.....  
podpis przyjmującego

**Odcinek dla posiadacza rachunku**

zł .....

**słownie** .....

wpłacający .....

imię, nazwisko, dokładny adres z kodem pocztowym  
na rachunek

Polskie Towarzystwo Biochemiczne  
02-093 Warszawa, ul. Pasteura 3  
PBK S.A. XIII/O Warszawa  
11101053-1225-2720-3-30

stempel

Pobrano opłatę  
zł .....

.....  
podpis przyjmującego

**Odcinek dla poczty lub banku**

zł .....

**słownie** .....

wpłacający .....

imię, nazwisko, dokładny adres z kodem pocztowym  
na rachunek

Polskie Towarzystwo Biochemiczne  
02-093 Warszawa, ul. Pasteura 3  
PBK S.A. XIII/O Warszawa  
11101053-1225-2720-3-30

stempel

Pobrano opłatę  
zł .....

.....  
podpis przyjmującego



**Pokwitowanie dla wpłacającego**

zł .....

**słownie** .....

wpłacający .....

imię, nazwisko, dokładny adres z kodem pocztowym  
na rachunek

Polskie Towarzystwo Biochemiczne  
02-093 Warszawa, ul. Pasteura 3  
PKO BP VIII/O Warszawa  
10201084-1791-270-201-111

stempel

Pobrano opłatę  
zł .....

.....  
podpis przyjmującego

**Odcinek dla posiadacza rachunku**

zł .....

**słownie** .....

wpłacający .....

imię, nazwisko, dokładny adres z kodem pocztowym  
na rachunek

Polskie Towarzystwo Biochemiczne  
02-093 Warszawa, ul. Pasteura 3  
PKO BP VIII/O Warszawa  
10201084-1791-270-201-111

stempel

Pobrano opłatę  
zł .....

.....  
podpis przyjmującego

**Odcinek dla poczty lub banku**

zł .....

**słownie** .....

wpłacający .....

imię, nazwisko, dokładny adres z kodem pocztowym  
na rachunek

Polskie Towarzystwo Biochemiczne  
02-093 Warszawa, ul. Pasteura 3  
PKO BP VIII/O Warszawa  
10201084-1791-270-201-111

stempel

Pobrano opłatę  
zł .....

.....  
podpis przyjmującego

Prenumerata POSTĘPÓW  
BIOCHEMII rok 1999  
dla nie zrzeszonych w PTBioch 40, — zł  
dla członków PTBioch 20, — zł  
dla zakładów i bibliotek 70, — zł

Składka P.T.Bioch.  
za rok 1999 30, — zł  
studenci 10, — zł

# Wskazówki dla autorów

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

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

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

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

Przekazanie artykułu do redakcji jest równoznaczne 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 artykułu ilustracje publikowane przez autorów prac cytowanych, należy uzyskać i przekazać nam odpowiednią zgodę na przedruk.

## Redakcja prosi Autorów o przestrzeganie następujących wskazówek szczegółowych:

**TEKST:** Maszynopis powinien być napisany jednostronnie czcionką wielkości standartowej, z podwójną interlinią, z lewym marginesem ok. 4 cm.

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

**Strona informacyjna** maszynopisu jest nienumerowana, zawiera imiona i nazwiska (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.

**PIŚMIENNICTWO:** Wykaz piśmiennictwa obejmuje prace w kolejności ich cytowania w tekście, zaznacza się je liczbami porządkowymi ujętymi w nawiasy kwadratowe, np. [3, 7, 9—26]. Odnosiłki 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. Po porozumieniu z Redakcją można proponować reprodukcję fotografii barwnych. 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 podejmuje 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”  
Polskie Towarzystwo Biochemiczne  
ul. Pasteura 3,  
02-093 Warszawa

