

POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE

# POSTĘPY BIOCHEMII

PL ISSN  
0032-5422

## Advances in Biochemistry

TOM 42, NR 1, 1996

Geny homeotyczne — Nobel 1995 . . . . .	2
Tlen a ekspresja genów . . . . .	6
Somatyczna terapia genowa . . . . .	14
Naprawa O <sup>6</sup> -metyloguaniny . . . . .	21
Naprawa oksydacyjnych uszkodzeń DNA . . . . .	31
Budowa i funkcja MHC I . . . . .	41
Objętość a metabolizm komórki . . . . .	49
Fitochrom . . . . .	57
Etylen . . . . .	65
Biochemia w sieci . . . . .	72
Sprawozdania . . . . .	75

***Kwartalnik „POSTĘPY BIOCHEMII”  
wydawany z pomocą finansową Ko-  
mitetu Badań Naukowych jest inde-  
ksowany przez MEDLINE, AGRO-LIB-  
REX***

<http://rcin.org.pl>

## WYDAWCA

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

Drukarnia Naukowo-Techniczna  
Mińska 65  
03-828 Warszawa

## REDAKCJA

Editorial Board  
REDAKTOR NACZELNY  
Editor in chief  
ZOFIA ZIELIŃSKA  
tel. 31-24-03  
REDAKTORZY  
Editors  
GRAŻYNA PALAMARCZYK  
tel. 658-47-02  
ANDRZEJ JERZMANOWSKI  
tel. 659-70-72 w. 3234  
ANNA SZAKIEL  
tel. 23-20-46  
BARBARA ZARZYCKA  
tel. 659-31-43  
JOLANTA GRZYBOWSKA  
tel. 13-05-15

## RECENZENCI ZESZYTU

Referees of this issue  
JERZY BAL  
(Warszawa)  
GRZEGORZ BARTOSZ  
(Łódź)  
TOMASZ BILIŃSKI  
(Zamość)  
MAREK GNIAZDOWSKI  
(Łódź)  
ANNA INGLOT  
(Wrocław)  
ALINA KACPERSKA  
(Warszawa)  
WŁODZIMIERZ KOROHDA  
(Kraków)  
STANISŁAW LEWAK  
(Warszawa)  
BARBARA TUDEK  
(Warszawa)

## ADRES REDAKCJI

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

## SPIS TREŚCI CONTENTS

<b>Nagroda Nobla 1995 r. w dziedzinie medycyny i fizjologii: Embriogeneza i geny homeotypczne</b> The Nobel prize 1995 in medicine and physiology: Embryogenesis and homeotic genes ANDRZEJ KACZANOWSKI, JANINA KACZANOWSKA . . . . .	2
<b>Reaktywne formy tlenu a regulacja ekspresji genów</b> Reactive oxygen species and the control of gene expression MAREK JURGOWIAK, KAROL BIAŁKOWSKI, RYSZARD OLIŃSKI . . . . .	6
<b>Somatyczna terapia genowa — czy jest bezpieczna?</b> Somatic gene therapy — is it safe? ŁUKASZ HUMINIECKI . . . . .	14
<b>Naprawa O<sup>6</sup>-metyloguaniny w DNA</b> Repair of O <sup>6</sup> -methylguanine — DNA EWA ŚLEDZIEWSKA-GÓJSKA . . . . .	21
<b>Naprawa oksydacyjnych uszkodzeń DNA u <i>Prokaryota</i></b> Prokaryotical mechanisms of DNA oxidative damage repair TOMASZ H. ZASTAWNY . . . . .	31
<b>Budowa i funkcja antygenów zgodności tkankowej (MHC) klasy I</b> Structure and function of the MHC class I molecules BOGDAN FALKIEWICZ, BOGDAN LIBEREK . . . . .	41
<b>Zmiany objętości komórek a modulacja ich metabolizmu</b> Changes of cell volume and the modulation of cellular metabolism TADEUSZ LIETZ . . . . .	49
<b>Fitochrom — struktura i właściwości</b> Phytochrome — structure and properties ANDRZEJ TRETYN, JUSTYNA WIŚNIEWSKA . . . . .	57
<b>Etylen — jego udział w regulacji dojrzewania owoców i starzenia się kwiatów. Aspekty biotechnologiczne</b> Ethylene — its role in the ripening and senescing processes of fruits and flowers. The biotechnological aspects MAŁGORZATA JAKUBOWICZ . . . . .	65
<b>Biochemia w sieci</b> Biochemistry on the network MACIEJ DRÓŻDŻ . . . . .	72
<b>Sprawozdania</b> Symposium “On Structure and Biological Functions of Nucleic Acid Components and their Analogues, and Related Topics” . . . . .	75
XXXI Zjazd Polskiego Towarzystwa Biochemicznego . . . . .	76
Sprawozdanie z działalności Zarządu Głównego Polskiego Towa- rzystwa Biochemicznego, XIV kadencja . . . . .	78
Protokół z XV Zwyczajnego Walnego Zebrania członków Pol- skiego Towarzystwa Biochemicznego . . . . .	86
Nowe Władze Towarzystwa . . . . .	88
Konferencja pt. “New frontiers in Cell and Molecular Biology” . . . . .	88
Konferencja pt. “Progress in Tumour Biology” . . . . .	89
Ogłoszenia Zarządu Głównego . . . . .	89

## Nagroda Nobla 1995 r. w dziedzinie medycyny i fizjologii: Embriogeneza i geny homeotyczne

### The Nobel prize 1995 in medicine and physiology: Embryogenesis and homeotic genes

ANDRZEJ KACZANOWSKI<sup>1</sup>,  
JANINA KACZANOWSKA<sup>2</sup>

Tegoroczną nagrodą Nobla uhonorowano niemiecką uczoną z Tybingi (Niemcy), **Christine Nüsslein-Volhard**, **Edwarda Lewisa**, emerytowanego amerykańskiego profesora z California Institute of Technology (U.S.A.), oraz **Erica Wieschausa**, Szwajcara od kilkunastu lat kierującego laboratorium w Princeton University (U.S.A.).

Nagroda ta została przyznana za pionierskie studia nad podstawami **funkcjonowania genów homeotycznych** (E. Lewis), odkryciom i opisem roli wielu **genów kontrolujących powstawanie osi ciała zarodka i udziałowi mechanizmów sygnalizacji w determinacji tych osi** u muszki owocowej *Drosophila melanogaster* (C. Nüsslein-Volhard i E. Wieschaus). Ogromne znaczenie tych badań nad wczesną embriogenezą *Drosophila* polega na tym, że wykryte mechanizmy dotyczą rozwoju wszystkich typów zarodków Metazoa z człowiekiem włącznie, a także roślin. Warto sobie również uświadomić, że jest to dopiero druga nagroda Nobla przyznana za badania nad rozwojem organizmów (pierwszą otrzymał niemiecki uczone Hans Spemann w 1935 r. za odkrycie tzw. organizatora i pierwotnej indukcji embrionalnej w rozwoju płazów). Przyjrzyjmy się wobec tego, jakie zasadnicze pytanie dotyczące rozwoju zarodka postawili sobie tegorocznymi nobliści i jaki był ich wkład w odpowiedź na to pytanie.

Badania noblistów, a także innych wielkich badaczy pominiętych w werdykcie Sztokholmu, dotyczyło fundamentalnego pytania, **w jaki sposób genetycznie zakodowana instrukcja w DNA może służyć jako instrukcja przestrzenna dla rozwoju zarodka**. A mówiąc bardziej opisowo: jak to się dzieje, że w rozwoju zapłodnionego jaja, lub wczesnego zarodka, tworzy się określony porządek przestrzenny różnicowania okolicy, przedniej, środkowej i tylnej oraz zdeterminowanie strony

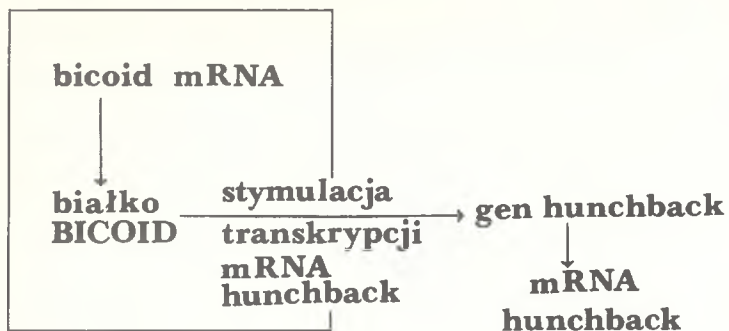
brzuszej i grzbietowej sugerujący istnienie mechanizmu programu przestrzennej determinacji losów komórek powstałych w trakcie mitoz w zależności od ich położenia w zarodku?

Badania genetyczne i embriologiczne Nüsslein-Volharda, a także Struhla, Gehringa i innych pozwoliły wykryć szereg genów matczyńskich u *Drosophila*, których mRNA lub białka determinowały powstawanie poszczególnych okolic ciała muszki. **Najwcześniejsze determinanty dotyczyły wyznaczenia losów zaledwie trzech okolic ciała przedniej, środkowej i tylnej kodowanych przez geny: bicoid, nanos, hunchback i kruppel i kilka innych** i podobne kilka genów matczyńskich determinujących stronę brzuszną i grzbietową zarodka. **W jaju poszczególne typy mRNA (a także niektóre translaty) tworzą nieprzypadkowy gradient gęstości rozmieszczenia cząsteczek w porządku przodo-tylnym, a inne tworzą gradient grzbietowo-brzuszy. Zgodnie z przypuszczeniami poszczególne rodzaje mRNA kodują różne białka o charakterze czynników transkrypcyjnych. W zależności od ich stężenia w danym obszarze zarodka, i ich wzajemnej interakcji poszczególne czynniki transkrypcyjne kontrolują włączenie, lub wyłączenie transkrypcji różnych grup genów w poszczególnych jego częściach.** W ten sposób Nüsslein-Volhard z współpracownikami wykryła, że mRNA genu *bicoid* stanowi determinantę przodu, a genu *nanos* wraz z innymi determinuje powstawanie części tylnych zarodka (Ryc. 1). Białko BICOID przez kombinację procesów aktywacji i represji stymuluje transkrypcję genów okolicy przedniej, a w strefie środkowej wyrażony jest HUNCHBACK, a z tyłu NANOS.

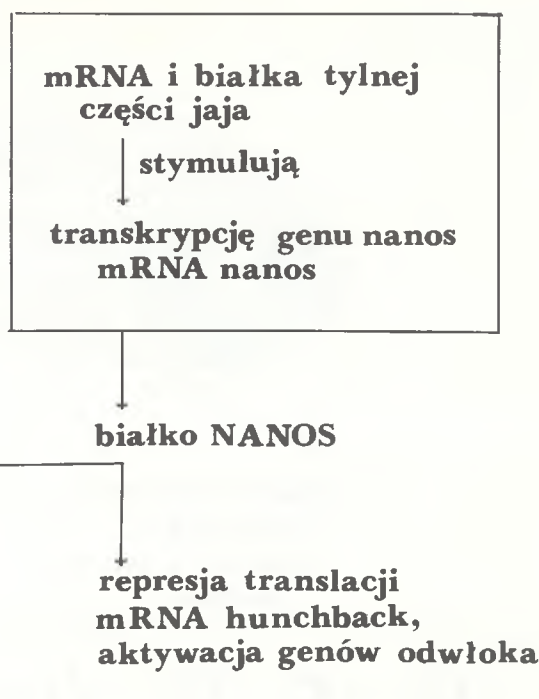
W trakcie rozwoju, w pewnym porządku hierarchicznym, poprzez kombinację różnych czynników transkrypcyjnych dochodzi do wyodrębnienia poszczególnych regionów (segmentów) w określonym porządku przodo-tylnym wraz z determinacją grzbietowo-brzuszną rozwoju poszczególnego segmentu

<sup>1, 2</sup> Prof. dr hab., Zakład Cytofizjologii, UW, ul. Krakowskie Przedmieście 26/28, 00-927 Warszawa

## Przednia część zarodka



## Tylna część zarodka



**białko HUNCHBACK,  
represja genów odwłoka  
i aktywacja transkrypcji  
genów głowy i tułowia**

Ryc. 1

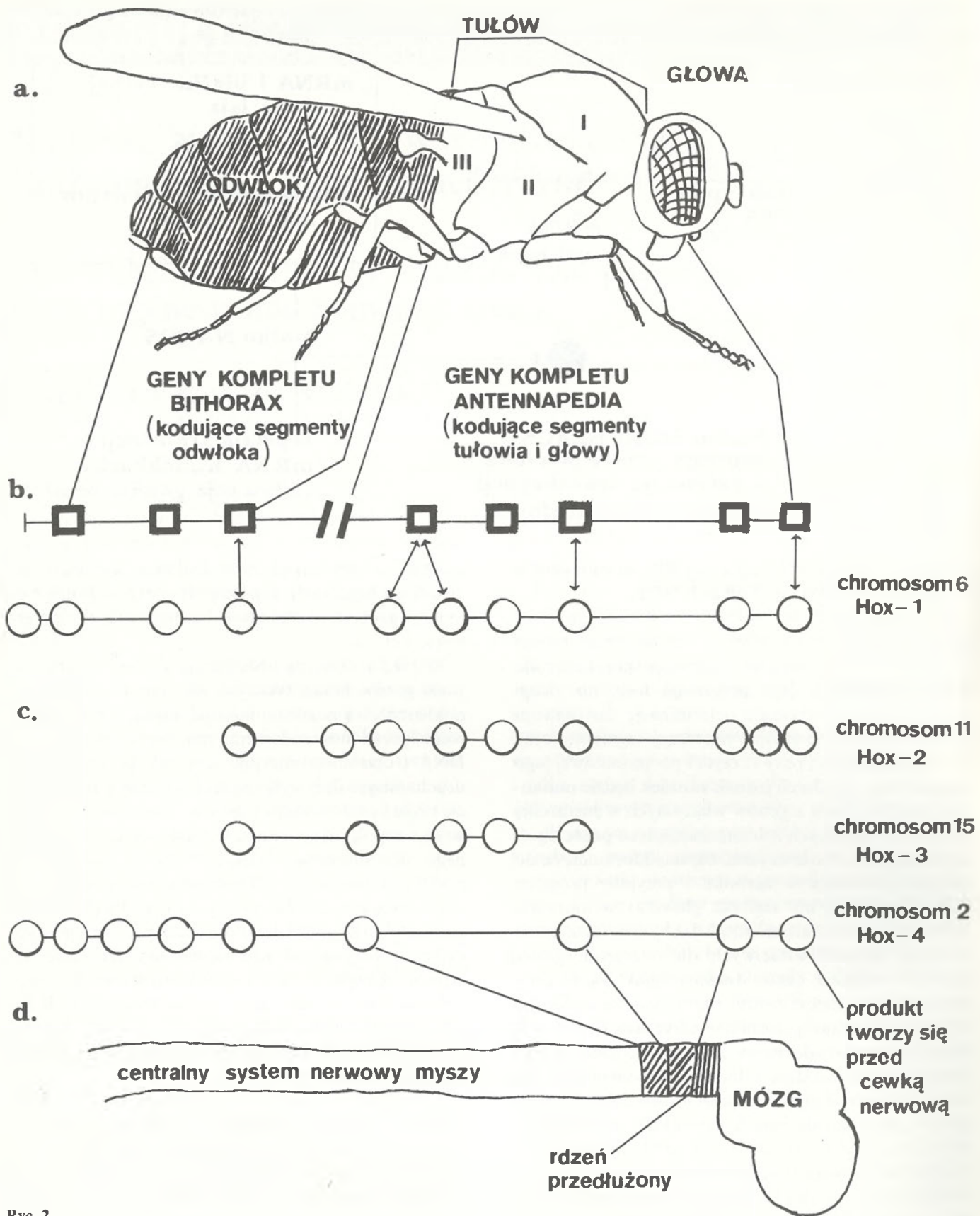
(Nüsslein-Volhard & Wieschaus, 1980, podsumowanie St. Johnson & Nüsslein-Volhard, 1992).

Lewis zauważył już w 1948 r., że istnieją geny kontrolujące rozwój muszki owocowej przez proces w którym **każdy z segmentów uzyskuje specyficzną dla siebie determinację jego przyszłego losu**, np. drugi segment tułowia uzyskuje determinację do rozwoju jednej pary nóg po stronie brzusznej segmentu, oraz wytworzenie jednej pary skrzydeł po grzbietowej jego stronie (Ryc. 2 a). Jeżeli jednak zarodek będzie mutantem jednego nawet z genów włączonych w hierarchię procesów związanych z determinacją losu poszczególnego segmentu, może uzyskać błędną informację co do swojego położenia w zarodku i przyjmie program innego segmentu np. segment głowowy w mutancie może wytwarzać parę nóg (tak jakby był segmentem tułowia), zamiast właściwych dla segmentu głowy czulków (mutacja genu: *Antennapedia*). Takie geny determinujące specyficznosc rozwoju poszczególnego segmentu nazwano **genami homeotycznymi, albo nadrzędnymi genami selektorowymi**. Mutacje homeotyczne mogą dotyczyć zaledwie jednego genu homeotycznego, ale ta zła kontrola powoduje przełączenie całego szeregu genów pod kontrolę innych czynników transkrypcyjnych. Lewis wykrył także, że mutanty homeotyczne są w genomie *Drosophila* zgrupowane koło siebie i w porządku odpowiadającemu przodo-tylnej determinacji segmentów zarodka (zasada kolinearności). Lewis zlokalizował występowanie kompletu genów homeotycznych w określonym miejscu chromosomu 3-ego określonego jako zespół *Antennapedia* (dla 4 genów kontrolujących okolicę głowy) kontynuowaną w następnym zespole nazwanym *Bithorax* (kontrola tułowia i odwłoka) (Ryc. 2b) (podsumowanie Lewis, 1878). Gehring i Garter (w Szwajcarii) i Scott i Kaufman (w USA)

w latach osiemdziesiątych wyizolowali komplety genów homeotycznych *Antennapedia* potwierdzając metodami genetyki molekularnej cytogenetyczne obserwacje Lewisa.

W 1983 r. Gehring i McGinnis (z USA) wykryli, że wiele genów homeotycznych ma wspólną sekwencję nukleotydową nazwaną **homeodomeną**. Białko kodowane przez homeodomenę ma powinowactwo do DNA i działa istotnie jako czynnik transkrypcyjny uruchamiając (lub wyłączając) kaskadową transkrypcję wielu kontrolowanych genów. McGinnis i Gehring wraz z współpracownikami w 1984 r. dokonali następnego przełomowego kroku. Wykazali bowiem, że podobne komplety genów homeotycznych znajdują się w genomie kręgowców: myszy i człowieka (McGinnis i inni, 1984) (Ryc. 2c) i determinują losy poszczególnych części centralnego układu nerwowego (Ryc. 2d). Następnie okazało się, że u roślin kontrola morfogenezy związana jest z obecnością genów zawierających homeodomenę (Schwartz-Sommer i inni, 1990). A oznacza to, że kontrola rozwoju przez geny homeotyczne ma charakter uniwersalny.

Jednakże nie wszystkie geny programu mają charakter czynników transkrypcyjnych; w dodatku mutacje niektórych genów zmieniających program rozwoju wczesnych stadiów embriogenezy nie ujawniają się w samym jajku, czy zarodku *Drosophila*, lecz transkrybowane są w przyległych do jajka komórkach foliularnych. Niektóre białka kodowane przez geny kontrolujące ustabilizowanie osi przodo-tylnej i grzbietowo-brzusznej mają charakter białek sygnalizacyjnych. Schupbach, Nüsslein-Volhard, Wieschaus i inni wykazali, że np. zdeterminowane już komórki foliularne przednie i tylne (przylegające do przedniej i tylnej części jajka) mogą wydzielać białka sygnałowe: np.



Ryc. 2

produkt genu *tailless* oddziałuje na odpowiednie receptory znajdujące się w przyległej części jaja. W tym przypadku są to receptory TORSO kodowane przez gen *torso*. Receptory torso mają charakter receptorowych kinaz tyrozynowych (RTK). Ich pobudzenie przez sygnał *TAILLESS* powoduje aktywację pew-

nych czynników transkrypcyjnych niezbędnych dla determinacji najbardziej skrajnych części ciała (przedniego akronu i tylnego telsonu). A więc otoczenie jaja i jego odpowiedzi na sygnały z zewnątrz stanowią następny ważny element w tworzeniu informacji przestrzennej programującej rozwój zarodka (Wieschaus

i inni, 1978, podsumowanie Duffy & Perrimon, 1994).

A teraz kilka słów o tym czym zajmują się obecnie tegorocznymi nobliści. Profesor Lewis jest już człowiekiem w podeszłym wieku (77 lat) ale wciąż bardzo aktywnym intelektualnie. Znacznie młodsza Dr Nüsslein-Volhard jest osobą zupełnie niezwykłą. Otóż mając takie ogromne sukcesy w badaniach nad embriogenezą *Drosophila*, trzy lata temu zmieniła obiekt badań. Obecnie pracuje nad embriogenezą pewnej małej rybki akwariowej. W ubiegłym roku (1995) po raz pierwszy w Tuluzie podsumowała imponujący wstępny dorobek tych ostatnich trzech lat. Także Dr Wieschaus pracuje bardzo aktywnie. Obecnie jego zainteresowania koncentrują się nad najwcześniejszymi etapami oogenezy *Drosophila* i bada on rolę cytoszkieletu i białek motorycznych w regulacji rozwoju jaja. Z pewnością warto będzie poznać nie tylko

przeszłe ale i przyszłe dokonania tych niezwykłych ludzi.

Artykuł otrzymano 14 grudnia 1995 r.

Zaakceptowano do druku 14 grudnia 1995 r.

## Piśmiennictwo

1. Duffy J B, Perrimon N (1994) *Dev Biol* 166: 380-395
2. Lewis E B (1978) *Nature* 276: 565-570
3. Nüsslein-Volhard C, Wieschaus E (1980) *Nature* 287: 795-801
4. McGinnis, Garter R.L. Wirz J, Kuroiwa A. Gehring WJ (1984) *Cell* 37: 403-408
5. Schwartz-Sommer Z, Huiser P, Nacken W, Saedler H, Sommer H (1990) *Science* 250: 931-936
6. St. Johnston D., Nusslein-Volhard C (1992) *Cell* 78: 201-219
7. Wieschaus E, Marsh IL, Gehring W (1978) *Rous Arch Dev Biol* 184: 75-82

**Zarząd Główny  
Polskiego Towarzystwa  
Biochemicznego**  
zaprasza do udziału w Konkursie  
na najlepszy wykład akademicki  
w roku 1996

### Regulamin nagrody

1. Intencją nagrody jest popularyzacja biochemii i biologii molekularnej oraz pozyskanie materiałów dydaktycznych.
2. Warunkiem wzięcia udziału w Konkursie jest przygotowanie wykładu na wybrany temat uwzględniający najnowsze osiągnięcia w tej dziedzinie oraz ilustrujących go materiałów w postaci maszynopisu, rysunków i kompletu przezroczy. Termin nadsyłania materiałów mija 30.04.1996 r.

Zarząd Główny Polskiego Towarzystwa Biochemicznego zorganizuje sesję, na której zostaną wygłoszone konkursowe wykłady. Maksymalny czas wystąpienia 2 x 45 minut. W 1995 roku sesja odbędzie się na początku czerwca. Nagroda Główna i wyróżnienia zostaną przyznane w dniu Konkursu

Członkowie Zarządu Głównego tworzą Komisję Konkursową. Oceniają oni prezentację, wartość merytoryczną i dydaktyczną wykładów przyznając od 0 do 10 punktów. Komisja obraduje

niejawnie, a protokół z obrad i inne materiały pozostają w dokumentacji Towarzystwa. Nagrodę uzyska osoba, która otrzyma największą liczbę punktów. Nazwisko zwycięzcy Konkursu zostanie podane do wiadomości Członków Polskiego Towarzystwa Biochemicznego w „Postępach Biochemii” oraz w „Listach”.

Materiały konkursowe: maszynopis wykładu, rysunki, przezrocza i programy komputerowe stają się własnością Polskiego Towarzystwa Biochemicznego i będą rozpowszechniane w placówkach naukowych i dydaktycznych jako wykłady autorskie nagrodzonych osób, rekomendowane przez Oddziały Polskiego Towarzystwa Biochemicznego. Wymagana jest pisemna zgoda na przekazanie materiałów na własność Towarzystwa. Towarzystwo zastrzega sobie prawo do zakupu materiałów nienagrodzonych.

Niniejsza wersja regulaminu została uchwalona przez Zarząd Główny Polskiego Towarzystwa Biochemicznego w dniu 5 listopada 1990 roku.

# \*Reaktywne formy tlenu a regulacja ekspresji genów

## \*Reactive oxygen species and the control of gene expression

MAREK JURGOWIAK<sup>1</sup>,  
KAROL BIAŁKOWSKI<sup>2</sup>,  
RYSZARD OLIŃSKI<sup>3</sup>

### Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Odpowiedź komórek prokariotycznych na szok tlenowy (*E. coli* i *S. typhimurium*)
- III. Odpowiedź komórek drożdży (*S. cerevisiae*) na podwyższone stężenie tlenu
  - III-1. Szok tlenowy u *S. cerevisiae*
    - III-1.1 yAP1/yAP2: jako funkcjonalne homologi ludzkich czynników transkrypcji (AP-1)
    - III-1.2. Czynniki Mac-1
- IV. Szok tlenowy a regulacja ekspresji genów u wyższych *Eukaryota*
  - IV-1. Białko HAP1—czynnik w ochronie komórek przed skutkami uszkodzeń DNA i zmian w koncentracji tlenu
  - IV-2. Nadtlenek wodoru—wtórny przekaźnik w procesie ekspresji roślinnych genów warunkujących systemową odporność na patogeny wirusowe
- V. Udział reaktywnych form tlenu w apoptozie komórek

**Wykaz stosowanych skrótów:** (·) — kropka przy symbolu rodnika oznacza obecność niesparowanego elektronu; SOD — dysmutaza nadtlenkowa; Cu Zn SOD — dysmutaza nadtlenkowa zawierająca miedź i cynk; Mn SOD — dysmutaza nadtlenkowa zawierająca mangan; GSH — forma zredukowana glutationu; TNF — czynnik martwicy nowotworu; AP-1, NF- $\kappa$ B, OxyR, Sox R/S, yAP1, yAP2, Mac-1 — czynniki transkrypcji; I- $\kappa$ B — podjednostka inhibitorowa czynnika NF- $\kappa$ B; HAP — zależne od hemu aktywatory transkrypcji; bcl-2 — protoonkogen kodujący białko Bcl-2.

### Wstęp

Przyjmuje się, że toksyczne właściwości tlenu są efektem tworzenia wolnych rodników tlenowych. Również takie związki jak H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i HClO, które powstają endogennie mogą w komórce ulec przekształceniu w wolne rodniki tlenowe. Wszystkie te czynniki określane są mianem „reaktywne formy tlenu”. Tlen, a dokładniej niektóre pochodne jego metabolizmu mogą, jak wykazano, już w minimalnych stężeniach powodować uszkodzenia różnych struktur komórkowych. W trakcie ewolucji organizmów musiały więc doskonalić się specyficzne mechanizmy ochronne związane między innymi z syntezą enzymów o działaniu antyoksydacyjnym [1-4].

### Contents:

- I. Introduction
- II. Oxidative stress response in prokaryotic cells (*E. coli* and *S. typhimurium*)
- III. Response to oxygen concentration in yeast cells (*S. cerevisiae*)
  - III-1. Oxidative stress in *S. cerevisiae*
    - III-1.1 yAP1/yAP2: as a functional homologues of human transcription factors (AP-1)
    - III-1.2. Mac-1 transcription factor
- IV. Oxidative stress and control of gene expression in higher *Eukaryota*
  - IV-1. HAP1 protein—cell defense factor against consequences of DNA damage and oxygen concentration changes
  - IV-2. Hydrogen peroxide as a second messenger in plant gene expression
- V. Reactive oxygen species in apoptosis

Modulacja syntezy białek, będąca odpowiedzią np. na szok tlenowy (patrz dalej), objęta jest kontrolą czynników transkrypcyjnych (aktywatorów transkrypcji). Zwiążanie czynników transkrypcyjnych z promotorem genu i regionem wzmacniającym (ang. *enhancer*) inicjuje transkrypcję i prowadzi do wzmożenia ekspresji produktu genu.

Stan szoku tlenowego następuje wówczas, gdy zaburzona zostaje fizjologiczna równowaga pomiędzy produkcją reaktywnych form tlenu i działaniem systemów antyoksydacyjnych, w tym mechanizmów naprawczych [5]. Stan ten charakteryzuje wzmożona produkcja takich pochodnych tlenu jak anionorodnik nadtlenkowy O<sub>2</sub><sup>-</sup>, nadtlenek wodoru H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i rodnik hydroksylowy ·OH. Wzmożone generowanie reaktywnych form tlenu może wynikać również z oddziaływania na

\* Wcześniej na łamach *Postępów Biochemii* ukazało się kilka artykułów dotyczących aktywnych form tlenu:

Kwiatowski J.M. Dysmutaza nadtlenkowa — struktura, funkcja i filogeneza. *Post Biochem* 34 (1988), 311-333;

Liczmański A.E. Toksyczność tlenu. I. Uszkodzenia żywych komórek. *Post Biochem* 34 (1988), 273-291;

— Toksyczność tlenu. II. Mechanizmy ochronne. *Post Biochem* 34 (1988), 293-310;

Sikora E. Udział aktywnych form tlenu w różnicowaniu, promocji nowotworu i starzeniu. *Post Biochem* 35 (1989), 563-574;

Gondko R. Czy przemiany rodników tlenowych w organizmie przebiegają cyklicznie? *Post Biochem* 41 (1995) 243-247.

<sup>1</sup>Dr, <sup>2</sup>mgr, <sup>3</sup>prof. dr hab, Katedra i Zakład Biochemii Klinicznej, Akademia Medyczna im. L. Rydygiera, ul. Karłowicza 24, 85-092 Bydgoszcz



komórki takich czynników jak promieniowanie jonizujące (gamma, rentgenowskie), UV, czy też środków chemicznych, do których należą np. parakwat, menadion, plumbagina [6]. Możliwość odpowiedzi na szok tlenowy cechuje komórki każdego organizmu, lecz słabo poznany jest, jak dotąd, jej system regulacyjny.

Reaktywne formy tlenu uszkadzają DNA, RNA, białka i lipidy komórkowe, z czym wiąże się patogenezę takich schorzeń człowieka jak: nowotwory, miażdżyca, dysfunkcje mózgu oraz procesy związane ze starzeniem się organizmu [7-11]. Zarówno komórki prokariotyczne jak i eukariotyczne eliminują skutki szoku tlenowego poprzez wzmoczoną syntezę białek przeciwdziałających reakcjom utleniania, w tym enzymów reperujących uszkodzenia DNA. W komórkach eukariotycznych funkcjonują nie tylko systemy chroniące przed skutkami szoku tlenowego, ale również mechanizmy kontrolujące generowanie reaktywnych form tlenu, które działając jako wtórne przekaźniki aktywują czynniki transkrypcji. W przypadku oddziaływania patogenów i odpowiedzi immunologicznej u wyższych *Eukaryota*, ta droga transdukcji sygnału ma szczególne znaczenie [1].

Systemy regulacyjne genów związanych z odpowiedzią na szok tlenowy są dość dobrze poznane w przypadku komórek bakteryjnych i niższych *Eukaryota*, jednak w przypadku wyższych organizmów eukariotycznych, głównie ssaków, ich poznanie napotyka na znacznie trudności [12, 13]. W komórkach ssaków odpowiedź na szok tlenowy wiąże się z aktywacją genów oksygenazy hemowej [14] i fosfatazy tyrozynowej [15] oraz promotorów zależnych od czynnika transkrypcyjnego AP-1 i NF- $\kappa$ B (NF-kappaB) [16].

## II. Odpowiedź komórek prokariotycznych na szok tlenowy (*E. coli* i *S. typhimurium*)

Synteza enzymów o działaniu antyoksydacyjnym może być indukowana w odpowiedzi na wzrost stężenia tlenu. Na przykład, natlenowanie podłoża hodowlanego wzmacnia aktywność SOD w komórkach wielu mikroorganizmów [17]. Przy wzroście stężenia  $H_2O_2$  w hodowli stwierdzono indukcję syntezy katalazy w komórkach *S. typhimurium* i *E. coli* [17].

Stosując metody elektroforetyczne, wykazano w komórkach *E. coli* indukcję syntezy około 80 białek stanowiących odpowiedź na szok tlenowy. Za regulację ekspresji genów w tych warunkach odpowiadają dwa czynniki transkrypcji, określane jako OxyR i SoxR/S. Czynniki te różnią się wrażliwością na działanie reaktywnych form tlenu, które pobudzają je do odpowiedzi: OxyR aktywowany jest przez  $H_2O_2$ , a SoxR/S przez  $O_2^{\bullet}$ .

Z około 30 genów, których ekspresja indukowana jest pod wpływem  $H_2O_2$  u *E. coli* i *S. typhimurium*, 9 zlokalizowanych jest w regulonie oxyR, kontrolowanym przez czynnik transkrypcyjny OxyR [18]. Kodują one takie enzymy jak: katalaza i reduktaza wodororo-

tenków alkilowych, które unieczynnają toksyczne formy tlenu. Wczesne badania wykazały, że tempo syntezy i poziom OxyR w komórce, nie zmienia się po stymulacji komórki przez nadtlenek wodoru [13]. Ponadto, wykorzystując metodę identyfikacji regionów wiązania DNA-białko (ang. *footprinting*) udowodniono, że izolowany OxyR — zarówno w stanie utlenionym jak i zredukowanym — wiąże się z sekwencjami promotorowymi odpowiednich genów. Jednakże, tylko izolowany OxyR, zarówno utleniony, jak i zredukowany i następnie utleniony *in vitro*, może stymulować przebieg transkrypcji [13]. Przypuszcza się, że w odpowiedzi na szok tlenowy OxyR podlega zmianom konformacyjnym umożliwiającym mu aktywację transkrypcji, ale tylko zredukowana forma OxyR funkcjonuje jako represor sekwencji promotorowej.

W przypadku *E. coli*, warunki tlenowe indukują wzmoczone generowanie  $O_2^{\bullet}$ , podobnie jak to ma miejsce w wyniku oddziaływania na te komórki parakwatu. Następstwem jest synteza około 40 białek, których produkcja nie jest indukowana w obecności  $H_2O_2$  [19]. Synteza 9 z tych białek jest warunkowana przez regulon *sox R/S* w dwóch *loci* genowych chromosomu *E. coli* [20, 21]. Przyjmuje się, że funkcją tych białek jest ochrona komórki przed skutkami nadprodukcji anionorodnika ponadtlenkowego. Są to takie białka jak: Mn SOD kodowana w genie *sod A*, dehydrogenaza glukozy-6-fosforanowa kodowana przez *zwf*, edonukleaza IV kodowana w *nfo* (reperująca wolnorodnikowe uszkodzenia DNA), Fum C — fumaraza kodowana przez *fum C* [22]. Regulon *sox R/S* jest również aktywowany przez tlenek azotu ( $NO^{\bullet}$ ), będący wolnym rodnikiem. Czułość na  $NO^{\bullet}$  warunkuje Sox R/S zależną odporność bakterii na tlenek azotu generowany przez makrofagi [23].

*Locus sox R/S* koduje dwa białka: SoxR i SoxS [24, 25]. W proponowanej przez niektórych autorów [12] hipotezie regulacji przyjęto, że sygnał generowany przez  $O_2^{\bullet}$  wyzwala aktywację czynników białkowych pre-SoxR. Aktywowany SoxR wyzwala następnie transkrypcję genu *sox S* [26, 27]. Nowo zsyntetyzowane białko SoxS (13 kD) należące do grupy Ara C aktywatorów prokariotycznych jest aktywatorem genów regulonu *soxR/S*. Białko SoxR (17 kD) jest zarówno receptorem wrażliwym na szok wywołany przez  $O_2^{\bullet}$  jak i transkrypcyjnym aktywatorem genu *soxS*. SoxR jest homologiem aktywatorów rodziny Mer R, które w obecności jonów  $Hg^{+2}$  wyzwala ekspresję operonu *mer*, uczestniczącego w metabolizmie tego toksycznego metalu [28]. Produkt Mer R wiąże  $Hg^{+2}$ , jednakże sam SoxR nie reaguje z metalami ciężkimi [26]. Wykazano, że zaktywowany SoxR indukuje transkrypcję genu dla SoxS, które następnie wyzwala wzmoczoną ekspresję takich genów jak genu kodującego Mn SOD [24].

Scharakteryzowane zostały dwie formy czynnika SoxR: Fe-SoxR zawierający niehemowe żelazo (powyżej 1,6 atomów na monomer) i apo-SoxR nie zawierają-

cy żelaza bądź innych metali [23]. Badania spektroskopowe wykazały, że Fe-SoxR zawiera aktywne oksydoredukcyjnie wiązanie żelazo-siarka (Fe-S), które ulega utlenianiu po ekstrakcji z komórek *E. coli*. Czynniki Fe-SoxR i apo-SoxR wiążą się *in vivo* z promotorem soxS chroniąc ten region przed działaniem DNazy I *in vitro*. Jednakże tylko Fe-SoxR stymuluje inicjację transkrypcji soxS w warunkach *in vitro*, podobnie jak ma to miejsce *in vivo*. Stymulacja ta zachodzi w wyniku związania polimerazy RNA i zajścia zmian konformacyjnych utlenionego Fe-SoxR w obrębie promotora soxS. Zróżnicowany stan redoks wiązania Fe-S SoxR ma w warunkach *in vivo* wpływ na modulację aktywności transkrypcyjnej tych białek w odpowiedzi na szok tlenowy. Aktywność transkrypcyjna SoxR nie zmienia się na skutek działania chelatorów, co jest prawdopodobnie wynikiem silnego związania Fe w SoxR.

### III. Odpowiedź komórek drożdży (*S. cerevisiae*) na podwyższone stężenie tlenu

Podobnie jak *E. coli*, drożdże *S. cerevisiae* to fakultatywne anaeroby. W środowisku tlenowym organizmy te wykorzystują hemowe grupy prostetyczne jako sensory tlenowe w regulacji metabolizmu. Hem jest idealnym sensorem, gdyż wszystkie enzymy niezbędne do jego syntezy są obecne w komórce podczas wzrostu anaerobowego [29]. Wiadomo natomiast, że tlen może być związany z syntezą hemu, a synteza niektórych hemoproteidów jest indukowana przez tlen [30].

Indukcja ekspresji genów kontrolowanych przez hem zachodzi za pośrednictwem zależnych od hemu aktywatorów transkrypcji określanymi jako HAP1 i działających w kompleksie z HAP2/3/4 (ang. *heme activation protein*). W przypadku HAP1, wiązanie hemu odsłania wiążące DNA domeny, indukując transkrypcję genów cytozolowej katalazy (CTT1) jak i Mn SOD (sod2). Mechanizm interakcji pomiędzy hemem i czynnikami HAP2/3/4 pozostaje nadal niejasny.

Wewnątrzkomórkowe stężenie hemu podlega ścisłej kontroli, umożliwiając organizmowi odpowiedź na zmiany w stężeniu tlenu. Wcześniej powszechnie przyjmowano, że hem jest efektem pośredniczącym w oddziaływaniu tlenu na komórki. Według najnowszych badań regulacja przez hem i tlen może być w kilku co najmniej przypadkach od siebie niezależna [31].

#### III-1. Szok tlenowy u *S. cerevisiae*

W coraz liczniejszych publikacjach podejmowane jest zagadnienie szoku tlenowego u drożdży [32, 33]. Dość wcześnie dokonano interesującej obserwacji, że komórki *S. cerevisiae* zawierają 6,5 razy więcej SOD i 2,3 razy większą ilość katalazy podczas wzrostu w środowisku zawierającym 100% O<sub>2</sub>, niż podczas wzrostu anaerobowego [17]. Obserwacje, że inkubacja

komórek drożdży z niskimi dawkami H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> chroni je przed wpływem następnych wysokich dawek nadtlenu, które są dawkami letalnymi dla *S. cerevisiae* wskazują wyraźnie, że komórki drożdży posiadają mechanizmy ochronne uruchamiane w szoku tlenowym [34]. Inkubacja komórek z menadionem, który jest czynnikiem wyzwalającym generowanie nadtlenu wodoru uruchamia mechanizmy obronne. Natomiast uprzednie działanie na komórki H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nie czyni ich opornymi na menadion, co sugeruje istnienie dwóch różnych, ale zależnych od szoku tlenowego dróg odpowiedzi u *S. cerevisiae*.

Nadmienić należy również o odkryciu u drożdży białka, o masie cząsteczkowej 27-kDa, któremu przypisuje się udział w ochronie antyoksydacyjnej komórki [17]. Jakkolwiek sposób indukcji syntezy i mechanizm działania tego enzymu jest słabo poznany (ostatnio przypisuje się mu aktywność reduktazy nadtlenu zależnej od tioredoksyny (*J Biol Chem* 269: 27670, 1994) to przypuszcza się, że indukcja syntezy białka 27-kDa zachodzi w odpowiedzi na wzrastające stężenie O<sub>2</sub>, Fe<sup>3+</sup>, bądź indukują ją egzogenne związki tiolowe.

#### III-1.1. yAP1/yAP2: jako funkcjonalne homologi ludzkich czynników transkrypcji (AP-1)

Geny YAP1 i YAP2 kodują, zaliczane do rodziny c-jun, czynniki transkrypcyjne komórek drożdży [35]. Wyizolowano dwa typy mutantów drożdżowych — yAP1 (określane też jako par-1 bądź sng-3) oraz yAP2, charakteryzujące się szczególną wrażliwością na menadion i H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Poprzez homologię z czynnikiem transkrypcyjnym AP-1 człowieka [36], sugerowany jest udział yAP1 i yAP2 w procesie regulacji ekspresji genów u drożdży. Ekspresja czynnika transkrypcyjnego AP-1 jest regulowana szokiem tlenowym, co omówiono w dalszej części pracy. Nadprodukcja yAP1 wzmacnia ekspresję genów białek odpowiedzi na szok tlenowy, takich jak: SOD, reduktaza glutationowa i reduktaza glukozy-6-fosforanowa, podczas gdy poziom wymienionych enzymów jest obniżony w przypadku zmutowanych szczepów yAP1 [37]. Ponadto, promotory genów dehydrogenazy glukozy-6-fosforanowej zawierają specyficzny dla AP-1 element odpowiedzi [38], implikujący udział yAP1 w regulacji aktywności tego enzymu.

Jak wykazano [39], wzmożona ekspresja yAP1 warunkuje wysoką odporność komórek drożdży na szok tlenowy. Zachodzi tu kontrolowany przez yAP1 wzrost transkrypcji genu tioredoksyny (*trx-2*). Niedawno przeprowadzone badania dowiodły natomiast, że produkt genu YAP2 nie uczestniczy w regulacji ekspresji *trx-2* [35]. Obserwacje, że zmutowane szczepy drożdży yAP1 wykazują wzrost produkcji enzymów antyoksydacyjnych w odpowiedzi na szok tlenowy, wskazują na istnienie dodatkowych mechanizmów ochrony tych komórek.

### III-1.2. Czynniki Mac-1

W ostatnim czasie sklonowano drożdżowy czynnik transkrypcji Mac-1 [40], który wzmacnia indukowaną przez  $H_2O_2$  transkrypcję genu cytozolowej katalazy (CTT1). Liczne prace wskazują na fakt pozytywnej kontroli transkrypcji genu CTT1, z udziałem specyficznych czynników transkrypcyjnych, będącej odpowiedzią na szok tlenowy [30, 41, 42]. Samo zagadnienie jest jednak na tyle obszerne, że wymagałoby osobnego, szczegółowego opracowania.

Mac-1 zawiera domenę wiążącą jony miedzi i reguluje transkrypcję genu katalazy oraz genu czynnika białkowego wiążącego miedź i żelazo. Mutanty mac-1 drożdży są bardzo wrażliwe na działanie metali ciężkich i  $H_2O_2$ . Można tu znaleźć homologię do bakteryjnego systemu występującego u *E. coli* [43] (SoxR jako homolog aktywatorów MerR-patrz rozdział II). Żelazo i miedź katalizują reakcję Habera-Weissa i uczestniczą w reakcji Fentona, w których generowane są reaktywne formy tlenu [5]. Takie czynniki jak chelatory metali ciężkich redukują produkcję reaktywnych form tlenu, a więc ich obecność efektywnie ogranicza skutki szoku tlenowego.

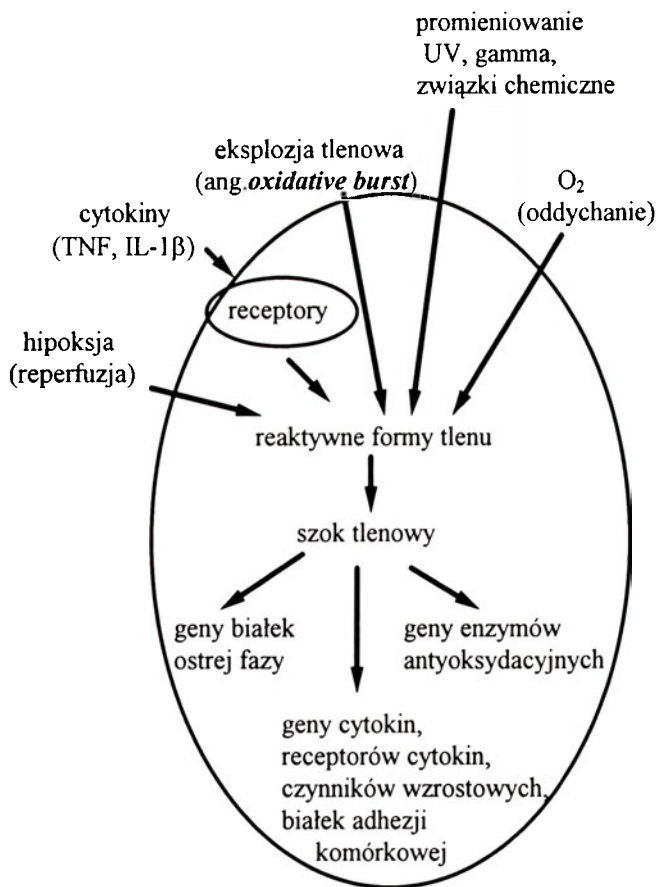
### IV. Szok tlenowy a regulacja ekspresji genów u wyższych *Eukaryota*

Wyższe *Eukaryota* to obligatoryjne aeroby wykorzystujące znaczną ilość energii generowanej w procesach oddechowych. Są one zatem narażone na działanie reaktywnych form tlenu powstających w procesie oddychania komórkowego. Pewna ilość reaktywnych form tlenu produkowana jest stale w przebiegu prawidłowego metabolizmu komórkowego. Ponadto stwierdzono, że wiele egzogennych czynników stymulować może stan szoku tlenowego w komórce, a przykładem może być ekspozycja na działanie niektórych leków i promieniowanie jonizujące. Stan szoku tlenowego wyzwalają także przyłączenie cząsteczek sygnałowych, takich jak cytokiny, do receptorów powierzchni komórkowej (Ryc. 1). Wskazuje się tu na reaktywne formy tlenu jako cząsteczki o funkcji wtórnych przekaźników komórkowych. Związanie cytokin przez specyficzny receptor wyzwalają w komórce szok tlenowy, którego wynikiem jest podwyższona koncentracja reaktywnych form tlenu, przekazujących tak generowany sygnał na czynniki transkrypcji aktywujące ekspresję genów [14].

W przypadku człowieka, wykazano znaczne implikacje kliniczne związane ze stanem nasilonego szoku tlenowego. Wzrastającą koncentrację reaktywnych form tlenu wiąże się z etiologią choroby Lou Gehriga (ALS, ang. *amyelotrophic lateral sclerosis*, stwardnienie zanikowe boczne). Pacjentów z rodzinnym wariantem tego schorzenia cechuje występowanie mutacji w genie Cu Zn SOD [45]. Odkąd wykazano, że gen Cu Zn SOD zlokalizowany jest w chromosomie 21 pary,

trisomia w obrębie tej pary autosomów (zespół Downa) wiązana jest z nadprodukcją miedziowo-cynkowej dysmutazy ponadtlenkowej. Reaktywne formy tlenu uwzględnia się również jako czynniki związane z uszkodzeniem istoty czarnej (*substantia nigra*) mózgu pacjentów z chorobą Parkinsona [46]. Ponadto, przyjmuje się coraz powszechniej, że proces starzenia się organizmu może być wynikiem postępującej kumulacji wolnorodnikowych uszkodzeń makromolekuł komórkowych (lipidy, białka, DNA) [47, 11]. W tym aspekcie istotne wydaje się zrozumienie mechanizmów regulujących ekspresję genów, które kodują enzymy antyoksydacyjne u wyższych *Eukaryota*.

Jak podano powyżej, w komórkach prokariotycznych białko znane jako OxyR, w stanie utlenionym po działaniu  $H_2O_2$ , funkcjonuje jako aktywator transkrypcji, indukujący produkcję zarówno katalazy jak i Mn SOD. Znane są, występujące w komórkach *Eukaryota*, dwa czynniki o działaniu podobnym do bakteryjnego czynnika OxyR, lecz niejasny, jak dotąd, jest mechanizm kontroli przez nie ekspresji genów, w tym kodujących SOD. W jednej z hipotez zakłada się wzrost powinowactwa czynnika transkrypcyjnego AP-1 do DNA, po utlenieniu reszt cysteiny składnika c-fos w obrębie AP-1 [48]. Czynniki transkrypcyjne AP-1 człowieka występuje w dwóch formach: w komórkach HeLa może być homodimerem białka c-jun, bądź heterodimerem złożonym z produktów protoonkoge-

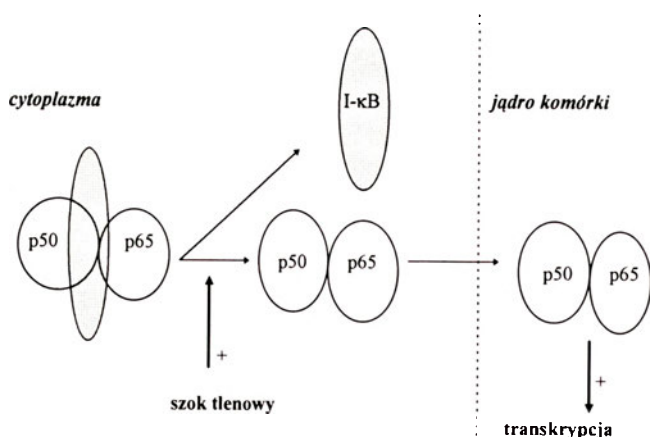


Ryc. 1 Wiele czynników oddziałujących na komórkę zwierzęcą przyczynia się do wzmoczonego generowania reaktywnych form tlenu, których zmiany stężenia w komórce mają wpływ na ekspresję niektórych grup genów.

nów c-jun i c-fos [49]. Kompleksy utworzone z białek rodziny Fos i Jun powodują, że AP-1 uczestniczy może w regulacji różnych systemów transkrypcyjnych [50]. Zsyntetyzowany pod wpływem szoku tlenowego AP-1 (heterodimer) wiąże się z odpowiednimi sekwencjami DNA w obrębie promotorów genów takich enzymów antyoksydacyjnych jak: NAD(P) reduktaza chinonowa i podjednostka Ya transferazy S-glutatio-nowej. Prawdopodobnie, również inne geny odpowiednie antyoksydacyjnej mogą być aktywowane przez czynnik transkrypcyjny AP-1.

NF- $\kappa$ B jest pierwszym poznany u *Eukaryota* czynnikiem transkrypcyjnym aktywowanym w odpowiedzi na szok tlenowy [51] (Ryc. 2). Prawdopodobnie, utlenienie inhibitorowej podjednostki jądrowego czynnika NF- $\kappa$ B decyduje o wzroście jego powinowactwa do DNA [44, 52]. Aktywna forma NF- $\kappa$ B jest heterodimerem podjednostek p50 i p65 wiążących DNA, a wykazano również, że do kompleksu NF- $\kappa$ B włączane mogą być podjednostki należące do rodziny czynników transkrypcyjnych rel. Inaktywacja NF- $\kappa$ B w cytoplazmie zachodzi poprzez związanie specyficznej podjednostki inhibitorowej I- $\kappa$ B. Aktywacja NF- $\kappa$ B jest wynikiem oddysocjowania podjednostki I- $\kappa$ B, która jest szybko degradowana, a uaktywniona forma NF- $\kappa$ B podlega translokacji do jądra komórkowego [53]. W przeprowadzonych badaniach [51] wykazano, że obecność mikromolowych stężeń H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> w podłożu hodowlanym aktywuje NF- $\kappa$ B wielu linii komórkowych. Czynnik transkrypcyjny wiąże się następnie z sekwencjami DNA, do których wykazuje powinowactwo. W efekcie, powoduje to aktywację ekspresji genów np. kodujących cytokiny, białka ostrej fazy, czynniki wzrostu, cząsteczki adhezji komórkowej i receptory cytokin. Większość genów aktywowanych z udziałem czynnika NF- $\kappa$ B, to geny wczesnej odpowiedzi komórki, aktywowane w warunkach patologicznych [1].

Poziom Cu Zn SOD w przypadku trisomii i mono-



**Ryc. 2** Mechanizm działania czynnika jądrowego NF- $\kappa$ B. Czynnik ten składa się z trzech podjednostek: p50, p65 oraz I- $\kappa$ B. Po odłączeniu podjednostki inhibitorowej I- $\kappa$ B i jej degradacji w cytoplazmie czynnik transkrypcyjny wnika do jądra komórki i reguluje syntezę wielu białek (dokładniejszy opis w tekście).

somii u człowieka jest odzwierciedleniem ilości kopii genu, co sugeruje, że w stanie nienasilonego szoku tlenowego ekspresja genu utrzymuje się na stałym poziomie. Jednakże nasilony szok tlenowy indukuje wzmożoną produkcję Cu Zn SOD lub Mn SOD. Na przykład, tlen indukuje syntezę Mn SOD, lecz nie indukuje syntezę Cu Zn SOD w płucach noworodków szczura [54]. Produkcja Mn SOD, peroksydazy glutationowej i katalazy jest indukowana w tchawiczo-oskrzelowych komórkach nabłonkowych przez nad-tlenek wodoru, podczas gdy anionorodnik ponad-tlenkowy indukuje syntezę wyłącznie Mn SOD [55]. Jak wynika z badań niektórych autorów [56], para-kwat indukuje syntezę CuZn SOD w leukocytach ludzkich, a podatność na indukcję jest odwrotnie proporcjonalna do wieku osobnika. Synteza Mn SOD jest, jak wykazano, indukowana poprzez oddziaływanie na komórki czynnik martwicy nowotworu (TNF), wyzwalający produkcję reaktywnych form tlenu [57, 58]. TNF aktywuje również NF- $\kappa$ B, co sugeruje istnienie związku pomiędzy oksydacyjną aktywacją tego czynnika a indukcją syntezy Mn SOD. Dowiedziono, że TNF zwiększa ekspresję Mn SOD na poziomie transkrypcji, co więcej, komórki nowotworowe z konstytucyjną syntezą mRNA dla Mn SOD wykazują oporność na TNF, a komórki nie produkujące mRNA-Mn SOD są na ten czynnik wrażliwe. Większość komórek nowotworowych ma niewykrywalny bądź obniżony poziom Mn SOD [59]. Są więc wrażliwe na niszczące działanie TNF, jakie czynnik ten wykazuje wobec komórek transformowanych. Może to być wynik mutacji w obrębie genu SOD, bądź nieprawidłowej syntezy czy też funkcjonowania czynnika transkrypcyjnego NF- $\kappa$ B.

Badania transgenicznych linii komórkowych mogą rzucić więcej światła na mechanizmy regulacji genów dysmutazy ponad-tlenkowej [10]. Wzmożona ekspresja genu Cu Zn SOD człowieka w komórkach mysich jest regulowana przez represję genu Mn SOD, nie wykazano jednakże czy możliwa jest sytuacja odwrotna. Zrozumienie mechanizmów kontrolujących ekspresję genów enzymów antyoksydacyjnych komplikują obserwacje, które wskazują, że nasiloną ekspresja ludzkiego genu Cu Zn SOD w mózгах transgenicznych myszy nie indukuje syntezy peroksydazy glutationowej, podczas gdy ma to miejsce w przypadku linii komórkowych (mysie komórki L i komórki neuroblastomy NS20Y). Fakt ten może być jednakże wynikiem różnic istniejących pomiędzy tymi typami komórek [10].

W świetle przytoczonych danych wnioskować można, że badania czynników transkrypcyjnych i mechanizmów regulacyjnych, które wpływają na ekspresję genów związanych z odpowiedzią komórki na szok tlenowy (m.in. znaczenia reaktywnych form tlenu jako wtórnych przekaźników), mogą mieć duże znaczenie nie tylko w naukach podstawowych, ale również między innymi w opracowaniu nowych sposobów

terapii chorób, których patogenezę wiąże się z nasileniem szoku tlenowego.

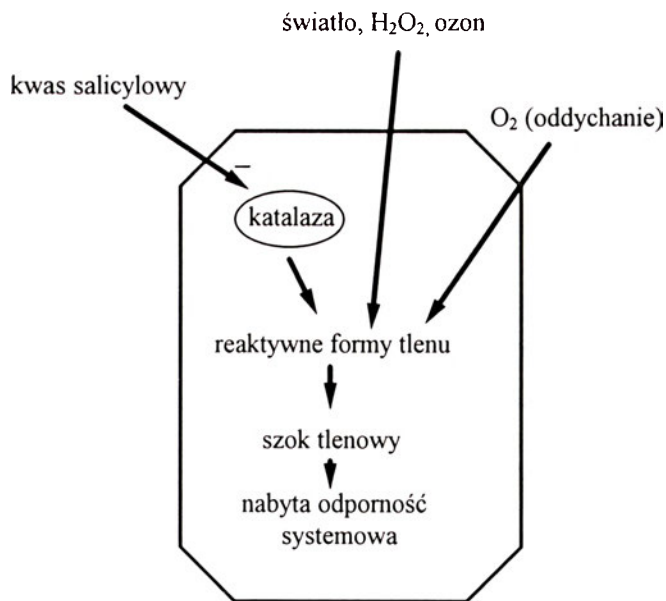
#### IV-1. Białko HAP1 — czynnik w ochronie komórek przed skutkami uszkodzeń DNA i zmian w koncentracji tlenu

Białko HAP1 (AP endonukleaza/3 fosfodiesteraza), określane również jako APE/Ref-1, to ludzki enzym jądrowy uczestniczący w reperacji apurynowych i apirymidynowych miejsc w DNA. Białko to cechuje również udział w regulacji stanu *redox* produktów różnych protoonkogenów, jak np. czynnika transkrypcyjnego c-Jun [60]. Zrozumienie biologicznej roli HAP1 stało się możliwe dzięki wykorzystaniu zjawiska ekspresji antysensownych HAP1 RNA w komórkach HeLa. Transfekowane (antysensownym HAP1 RNA) komórki HeLa wykazują, zarówno prawidłowe tempo wzrostu, jak i cechy morfologiczne, są jednak nadwrażliwe na działanie czynników uszkodzających DNA (nadtlenek wodoru, menadion, parakwat). Komórki takie są również nadwrażliwe na zmiany stężenia tlenu. Wykazano ich nasilone zamieranie, w odróżnieniu od komórek kontrolnych, w warunkach niedotlenienia (hipoksji, 1% tlenu), jak i w środowisku o podwyższonym stężeniu tlenu (hiperoksji, 100% tlenu) [61]. W warunkach fizjologicznych komórki często przechodzą łagodny szok wywołany przez zmiany stężenia tlenu. Wysoki poziom tlenu jest jednak przyczyną nasilonej produkcji w komórkach reaktywnych form tlenu, uszkodzających makromolekuły komórkowe (np. DNA). Wiele komórek ludzkiego ciała narażonych jest również na znaczny spadek stężenia tlenu. Komórki śródbłonna naczyń krwionośnych podlegają niedotlenieniu na skutek obniżenia stężenia tlenu we krwi. Odpowiedzią na tego typu szok jest synteza tzw. białek stresowych, których funkcja nie jest bliżej poznana, wiadomo natomiast, że utrzymują się one w komórce na podwyższonym poziomie przez cały okres niedotlenienia.

Wykazano, że ekspresja białek HAP1 jest indukowana w komórkach ludzkich podczas wzrostu w warunkach ograniczonego dostępu tlenu, a komórki transfekowane (antysensownym HAP1 i RNA) wykazują nadwrażliwość na działanie inhibitorów syntezy glutationu. Najprawdopodobniej, HAP1 odgrywa kluczową rolę w ochronie komórek przed skutkami działania czynników uszkodzających DNA i zmianami spowodowanymi obniżeniem bądź podwyższeniem stężenia tlenu [61].

#### IV-2. Nadtlenek wodoru — wtórny przekaźnik w procesie ekspresji roślinnych genów warunkujących systemową odporność na patogeny wirusowe

Roślina zainfekowana wirusem mozaiki tytoniowej staje się po kilku tygodniach odporna na ponowne



Ryc. 3 Czynniki wpływające na poziom reaktywnych form tlenu i ekspresję genów związanych z patogenezą w komórce roślinnej. Dokładniejsze objaśnienia w tekście.

infekcje, nawet ze strony innych patogenów [62]. Co ciekawsze, odporność taka dotyczy nie tylko miejsca uprzednio zainfekowanego, lecz całej rośliny. Stąd też zjawisko to nazwano nabytą odpornością systemową (ang. *systemic acquired resistance*). W trakcie nabywania takiej odporności dochodzi do ekspresji kilku rodzin genów, nazwanych ogólnie genami związanymi z patogenezą (ang. *pathogenesis-related genes* lub *PR-genes*) [63]. Ekspresja tych genów aktywowana jest poprzez kwas salicylowy, produkowany przez komórki roślinne i pełniący rolę cząsteczki sygnałowej w procesie odpowiedzi immunologicznej rośliny (Ryc. 3) [64]. Receptorem wiążącym kwas salicylowy jest rezydujące na terenie cytoplazmy białko, które zostało ostatnio zidentyfikowane, jako białko o aktywności katalazy [65]. Połączenie się cząsteczki kwasu salicylowego z białkiem receptorowym powoduje obniżenie o 80% jego aktywności katalazowej, co wywołuje znaczny wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia nadtlenu wodoru. Dane te sugerują, że H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> może być mediatorem ekspresji genów związanych z nabytą odpornością. Sugestię taką potwierdza fakt, iż do ekspresji tych genów dochodzi również po nastrzyknięciu liścia rośliny 1-5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> lub roztworami związków promujących tworzenie się nadtlenu wodoru wewnątrz komórek (np. parakwatu). Chociaż czynniki transkrypcyjne aktywujące ekspresję genów odpowiedzialnych za odporność na patogen nie są jeszcze znane, to jednak istnieje duże prawdopodobieństwo, że są one aktywowane poprzez reakcję typu redoks, w której bierze udział nadtlenek wodoru.

#### V. Udział reaktywnych form tlenu w apoptozie komórek

Proces apoptozy, czyli programowanej śmierci komórki znajduje się ostatnio w polu zainteresowań

wielu ośrodków naukowych. Duże zainteresowanie apoptozą ma odbicie chociażby w coraz liczniejszych artykułach ukazujących się w polskim piśmiennictwie przeglądowym [66-68]. Jednakże stosunkowo mało uwagi zwraca się w tych pracach na udział rodników tlenowych w tym ciągle nie do końca poznanym zjawisku. Jest to interesujące, w świetle omawianych powyżej zagadnień, ponieważ wzmożoną aktywację czynnika transkrypcyjnego NF- $\kappa$ B wiąże się obecnie z mechanizmem programowanej śmierci komórki [69].

Stan szoku tlenowego jest brany pod uwagę jako jeden z czynników wyzwalających apoptozę. Popiera to założenie wiele niezależnych obserwacji dotyczących różnych systemów biologicznych, w których wykazano indukcję apoptozy poprzez mechanizmy oksydacyjne [69, 70]. Na udział reaktywnych form tlenu w programowanej śmierci komórki wskazują obserwacje, z których wynika, że utleniacze (nadtlenek wodoru) bądź czynniki wyzwalające generowanie reaktywnych form tlenu takie jak: promieniowanie UV, czy TNF-indukują apoptozę, podczas gdy antyoksydanty takie jak: N-acetylocysteina, analogi witaminy E i peroksydaza glutationowa hamują procesy wyzwalające apoptozę. Ekspozycja już na niskie dawki (10-100 $\mu$ M) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> indukuje apoptozę różnego typu komórek [71]. Również tlenek azotu (NO $\cdot$ ) brany jest pod uwagę jako czynnik wyzwalający apoptozę makrofagów i monocytów [72], co ciekawe rodnik ten może reagować z tlenem cząsteczkowym, czego wynikiem jest powstanie wysoce agresywnej cząsteczki NO<sub>2</sub> oraz takich aktywnych form tlenu jak O<sub>2</sub> $\cdot$  i H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [73]. Wykazano, że limfocyty T zainfekowane wirusem HIV są szczególnie podatne na apoptozę indukowaną szokiem tlenowym, co więcej komórki takie cechuje znacznie obniżony poziom enzymów antyoksydacyjnych (SOD, katalaza, peroksydaza glutationowa) [70]. Niektóre środki chemiczne i leki (np. sulfoksamina butioniny) obniżać mogą poziom zredukowanego glutationu (GSH), co czyni komórki bardziej podatnymi na indukowaną szokiem tlenowym apoptozę. Podobną zależność obserwowano w badaniach ludzkich limfocytów T. Wykazano mianowicie, że poziom pozakomórkowej katalazy moduluje podatność tych komórek na programowaną śmierć indukowaną podwyższonym poziomem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Ponadto, protoonkogen bcl-2, którego produkt białkowy chroni komórki przed apoptozą jest brany pod uwagę jako czynnik w antyoksydacyjnej drodze ochrony komórki [69]. Podobnie adenowirusowe białko E1B, będące funkcjonalnym homologiem białka Bcl-2 chroni przed programowaną śmiercią indukowaną czynnikiem TNF czy też p53 [70]. Ostatnio pojawiły się doniesienia, że białka Bcl-2 mogą chronić komórki nie tylko przed apoptozą, ale także przed śmiercią nieprogramowaną następującą w wyniku uszkodzenia mechanicznego, niedokrwienia w wyniku zawału, czy niektórych chorób degeneracyjnych, a wiadomo, że stany te związane są z nadmiernym gromadzeniem w komór-

ce reaktywnych form tlenu [70].

Jedną z bardziej atrakcyjnych hipotez tłumaczących mechanizm aktywacji komórkowego systemu wyzwalającego apoptozę jest hipoteza wiążąca metalo- i rodniko-zależną aktywację czynników transkrypcyjnych prowadzącą do śmierci komórki. Interesujące jest, że 1,10-fenantrolina (chelator jonów Cu — generujących w wyniku reakcji Fentona wolne rodniki tlenowe) blokuje wiązanie aktywnego kompleksu receptora glukokortykoidowego do DNA [74]. Cytowani autorzy sugerują, że aktywowany kompleks jest metaloproteiną.

Szok tlenowy aktywuje czynnik transkrypcyjny NF- $\kappa$ B, a liczne antyoksydanty hamują ten proces [51]. Jeden ze związków blokujących aktywację NF- $\kappa$ B (ditiokarbaminian piroolidyny) w sposób znaczący ogranicza indukcję apoptozy przez deksametazon. Dane te sugerują, że NF- $\kappa$ B odgrywa krytyczną rolę w modulacji apoptozy, a ponadto wykazano [75] silną aktywację AP-1 i NF- $\kappa$ B w tymocytach ulegających apoptozie pod wpływem szoku cieplnego i deksametazonu. Na podstawie przeprowadzonych badań [69] dowiedziono, że rodniki hydroksylowe generowane w przebiegu Cu-zależnej reakcji Fentona wyzwalają apoptozę poprzez nasiloną aktywację czynnika transkrypcyjnego NF- $\kappa$ B.

Aktywacja NF- $\kappa$ B wyzwalająca apoptozę tymocytów jak i rola jonów metali (np. Cu) oraz wolnych rodników w tym procesie jest obiektem coraz liczniejszych badań, których wyniki mogą rzucić nieco więcej światła na ten jakże mało przez nas jeszcze poznany proces. Ponadto zdobyta wiedza będzie mogła być wykorzystywana praktycznie np. do uśmiercania komórek nowotworowych jak i ochrony komórek ginących na skutek chorób degeneracyjnych takich jak choroba Parkinsona i Alzheimerera.

#### Podziękowanie

Praca finansowana przez Komitet Badań Naukowych. Numer projektu badawczego 4PO5A. 121.08

Artykuł otrzymano 8 marca 1995 r.  
Zaakceptowano do druku 9 listopada 1995 r.

#### Piśmiennictwo

1. Pahl H L, Baeuerle P A (1994) *Bio Essays* 16: 497-502
2. Gensler H L, Bernstein H (1981) *Quarterly Reviews in Biology* 56: 279-303
3. Pacifici R E, Davies K J (1991) *Gerontology* 37: 166-180
4. Oliński R (1993) *Post Hig Med Dośw* 47: 463-474
5. Halliwell B (1993) *Haemostasis* 23: (suppl 1): 118-126
6. Storz G, Tartaglia L A, Farr S B, Ames B N (1990) *Trends Genet* 6: 363-368
7. Cerutti P A (1991) *Eur J Clin Invest* 21: 1-5
8. Ames B N, Gold L S (1991) *Mutation Res* 250: 3-16
9. Joenje H, Lafler M V M, Retel J (1991) W: Vigo-Pelfrey C (red) *Membrane Lipid Oxidation III*, CRC Press, Boca Raton, FL, str 87-113
10. Warner H R (1994) *Free Rad Biol Med* 17: 249-258
11. Jurgowiak M, Oliński R (1995) *Kosmos* 44: 71-88
12. Demple B, Amabile-Cuevas C F (1991) *Cell* 67: 837-839

13. Storz G, Taraglia LA, Ames BN (1990) *Science* **248**: 189-194
14. Keyse SM, Tyrrel RM (1989) *Proc Natl Acad Sci USA* **86**: 99-103
15. Keyse SM, Emslie EA (1992) *Nature (Lond)* **359**: 644-647
16. Meyer M, Schreck R, Baeuerle PA (1993) *EMBO J* **12**: 2005-2015
17. Kim IH, Kim K, Rhee SG (1989) *Proc Natl Acad Sci USA* **86**: 6018-6022
18. Christman MF, Morgan RW, Jacobson FS, Ames BN (1985) *Cell* **41**: 753-762
19. Greenberg JT, Demple B (1989) *J Bacteriol* **171**: 3933-3939
20. Greenberg JT, Monach P, Chou JH, Josephy PD, Demple B (1990) *Proc Natl Acad Sci USA* **87**: 6181-6185
21. Tsaneva IR, Weiss B (1990) *J Bacteriol* **172**: 4197-4205
22. Liochev SI, Fridovich I (1992) *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 5892-5896
23. Hidalgo E, Demple B (1994) *EMBO J* **13**: 138-146
24. Amabile-Cuevas CF, Demple B (1991) *Nucleic Acids Res* **19**: 4479-4484
25. Wu J, Weiss B (1991) *J Bacteriol* **173**: 2864-2871
26. Nunoshiba T, Hidalgo E, Amabile-Cuevas CF, Demple B (1992) *J Bacteriol* **174**: 6054-6060
27. Wu J, Weiss B (1992) *J Bacteriol* **174**: 3915-3920
28. Summers AO (1992) *J Bacteriol* **174**: 3097-3101
29. Labbe-Rosine R, Labbe P (1990) W: Dailey HA (red) *Biosynthesis of Heme and Chlorophylls*, McGraw-Hill Book Co., New York, str 235-285
30. Wieser R, Adam G, Wagner A, Schuller Ch, Marchler G, Ruis H, Krawiec Z, Biliński T (1991) *J Biol Chem* **266**: 12406-12411
31. Chelstowska A, Rytka J (1993) *Post Biochem* **39**: 173-185
32. Biliński T, Krawiec Z, Liczmański A, Litwińska J (1985) *Biochem Biophys Res Commun* **130**: 533-539
33. Lin Su-Ju, Cizewski Cullota V (1995) *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 3784-3788
34. Collinson LP, Dawes IW (1992) *J Gen Microbiol* **138**: 329-335
35. Stephen DWS, Rivers SL, Jamieson DJ (1995) *Molecular Microbiology* **16**: 415-423
36. Harschman K D, Moye-Rowley WS, Parker CS (1988) *Cell* **53**: 321-330
37. Schnell N, Krems B, Entian K D (1992) *Curr Genet* **21**: 269-273
38. Nogaie I, Johnston M (1990) *Gene* **96**: 161-169
39. Kuge S, Jones N (1994) *EMBO J* **13**: 655-664
40. Jungmann J, Reins HA, Lee J, Romeo A, Hassett R, Kosman D, Jentsch S (1993) *EMBO J* **12**: 5051-5056
41. Biliński T, Krawiec Z, Litwińska J, Błaszczyński M (1988) W: Oxy-Radicals in Molecular Biology and Pathology. Alan R. Liss, Inc., str 109-123
42. Schuller C, Brewster JL, Alexander MR, Gustin MC, Ruis H (1994) *EMBO J* **13**: 4382-4389
43. Summers AO (1992) *J Bacteriol* **172**: 4197-4205
44. Schreck R, Rieber P, Baeuerle PA (1991) *EMBO J* **10**: 2247-2258
45. Rosen DR (1993) *Nature (Lond)* **362**: 59-62
46. Oertel WH, Kupsch A (1993) *Curr Opin Neurol Neurosurg* **6**: 323-332
47. Harman D (1993) *Drug and Aging* **3**: 60-80
48. Okuno H, Akahori A, Sato H, Xanthoudakis S, Curran T, Iba H (1993) *Oncogene* **8**: 695-701
49. Karin M (1991) *Curr Opin Cell Biol* **3**: 467-473
50. Sonobe MH, Yoshida T, Murakami M, Kameda T, Iba H (1995) *Oncogene* **10**: 689-696
51. Schreck R, Meier B, Mannel D, Droge W, Baeuerle PA (1992) *J Exp Med* **175**: 1181-1194
52. Toledano MB, Leonard WJ (1991) *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 4328-4332
53. Henkel T, Machleidt T, Alkalay I, Kronke M, Ben-Neriah Y, Baeuerle PA (1993) *Nature (Lond)* **365**: 182-185
54. Stevens JB, Autor AP (1977) *J Biol Chem* **252**: 3509-3514
55. Schull S, Heintz NH, Periasamy M, Manohar M, Janssen YMW, Marsh JP, Mossman BT (1991) *J Biol Chem* **266**: 24398-24403
56. Niwa Y, Ishimoto K, Kanoh T (1990) *Blood* **76**: 835-841
57. Wong GHW, Elwell JH, Oberley LW, Goeddel DV (1989) *Cell* **58**: 923-931
58. Kinnula VL, Pietarinen P, Aalto K, Virtanen I, Raivio KO (1995) *Am J Physiol* **268**: (Lung Cell Mol Physiol **12**): L71-L77
59. Wong GHW, Goeddel DV (1988) *Science* **242**: 941-944
60. Xanthoudakis S, Curran T (1992) *EMBO J* **11**: 653-665
61. Walker LJ, Craig RB, Harris AL, Hickson ID (1994) *Nucleic Acids Research* **22**: 4884-4889
62. Kuc J (1982) *Bio Science* **32**: 854-857
63. Ward E (1991) *Plant Cell* **3**: 1085
64. White RF (1978) *Virology* **99**: 410-420
65. Chen Z, Silva H, Klessing DF (1993) *Science* **262**: 1883-1886
66. Rożynkova D (1994) *Post Biol Kom* **21**: 303-318
67. Góra-Tabor J, Robak T (1994) *Post Hig Med Dośw* **48**: 209-225
68. Sikora E (1994) *Post Biochem* **40**: 150-160
69. Wolfe JT, Ross D, Cohen GM (1994) *FEBS Lett* **352**: 58-62
70. Buttke TM, Sandstrom PA (1994) *Immunology Today* **15**: 7-10
71. Lennon SV, Martin SJ, Cotter TG (1991) *Cell Prolif* **24**: 203-214
72. Albina JE, Cui S, Mateo RB, Reichner JS (1993) *J Immunol* **150**: 5080-5085
73. Stamler JS, Singel DJ, Loscalzo J (1992) *Science* **258**: 1898-1902
74. Schmidt TJ, Sekula BC, Litwack G (1981) *Endocrinology* **109**: 803-812
75. Sikora E, Grassilli E, Radziszewska E, Bellesia E, Barbieri D, Franceschi C (1993) *Biochem Biophys Res Commun* **197**: 709-715



## 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”.

# Somatyczna terapia genowa — czy jest bezpieczna?

## Somatic gene therapy — is it safe?

ŁUKASZ HUMINIECKI\*

### Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Efekty uboczne związane z wektorem
  - II-1. Insercyjna mutageniza
  - II-2. Reakcja immunologiczna
  - II-3. Toksyczność kationowych liposomów
  - II-4. Nabywanie zdolności do replikacji
- III. Efekty uboczne związane z genem terapeutycznym
  - III-1. Toksyczność cytokin
  - III-2. Problem strategii antysensu
- IV. Inne niepożądane zjawiska
  - IV-1. Przedostanie się nowych odmian wirusów do środowiska
  - IV-2. Warunki hodowli *in vitro*
  - IV-3. Zanieczyszczenie lipopolisacharydem DNA izolowanego z hodowli *E. coli*
  - IV-4. Iniekcje komórek produkujących wektor
  - IV-5. Zabiegi towarzyszące
- V. Uwagi końcowe

**Wykaz stosowanych skrótów:** LTRs — długie terminalne powtórzenia; AAV — wirus adenosatelitarny; BPV-1 — byłący wirus *Papilloma* typu pierwszego; PCR — reakcja łańcuchowa polimerazy; MHC II — kompleks głównych antygenów zgodności tkankowej typu drugiego; TNF — czynnik nekrozy nowotworów; IL — interleukina; RAC — Recombinant DNA Advisory Committee; YAC — Yeast Artificial Chromosomes; HIV — Human Immunodeficiency Virus; GTI — Genetic Therapy Incorporation; LPS — lipopolisacharyd; MDR-1 — gen oporności wielolekowej typu pierwszego; GM-CSF — czynnik stymulujący wzrost kolonii granulocytów i makrofagów; G-CSF — czynnik stymulujący wzrost kolonii granulocytów.

### I. Wstęp

Bardzo wiele pisze się dziś o terapii genowej. Dominują opinie skrajne, często nie oparte na faktach, a tylko intuicyjnej sympatii bądź niechęci. Entuzjaści twierdzą, że każde z ostatnich stuleci miało swój wielki przełom w medycynie: wiek osiemnasty — osiągnięcia w dziedzinie fizjologii i farmakologii; wiek dziewiętnasty — aseptykę i początki anestezjologii w chirurgii; wiek dwudziesty — wprowadzenie do leczenia antybiotyków i transplantologii. W praktyce terapeutycznej dwudziestego pierwszego wieku widzą oni zastosowanie terapii genowej. Przeciwnicy uważają, że jest to w rzeczywistości metoda niebezpieczna, nieskuteczna i wyjątkowo droga.

Rzetelna ocena perspektyw praktycznego wdrożenia terapii genowej wymaga dokładnej analizy przede

### Contents:

- I. Introduction
- II. Side-effects related to vector
  - II-1. Insertional mutagenesis
  - II-2. Immunological response
  - II-3. Toxicity of cationic liposomes
  - II-4. Replication-competent viruses
- III. Side-effects related to therapeutic gene
  - III-1. Toxicity of cytokins
  - III-2. Problem of antisense strategy
- IV. Other complications
  - IV-1. Development of new virus strains in the environment
  - IV-2. Conditions of *in vitro* cell cultures
  - IV-3. Lipopolisaccharid contamination of DNA isolated from *E. coli*
  - IV-4. Injections of vector producing cells
  - IV-5. Attendant manipulations
- V. Conclusions

wszystkim dwóch zagadnień: bezpieczeństwa i skuteczności. Na to drugie jest jeszcze zbyt wcześnie. Obecnie przeprowadzane próby kliniczne I fazy służą bowiem tylko ustaleniu ewentualnych skutków ubocznych. Dopiero próby II i III fazy pozwolą na oszacowanie skuteczności terapii genowej i porównanie jej z innymi metodami leczenia. Właśnie kwestiom bezpieczeństwa chciałbym poświęcić niniejszą pracę. Jej zrozumienie wymaga jednak podstawowej wiedzy o terapii genowej. Dobrym wstępem mogłaby być lektura mojego poprzedniego artykułu „Terapia genowa — wektory i strategie” (*Post Biochem* 4/95). W dalszej części artykułu zamieszczam krótkie omówienie najczęstszych zagrożeń oraz metod minimalizowania wynikających z nich skutków ubocznych.

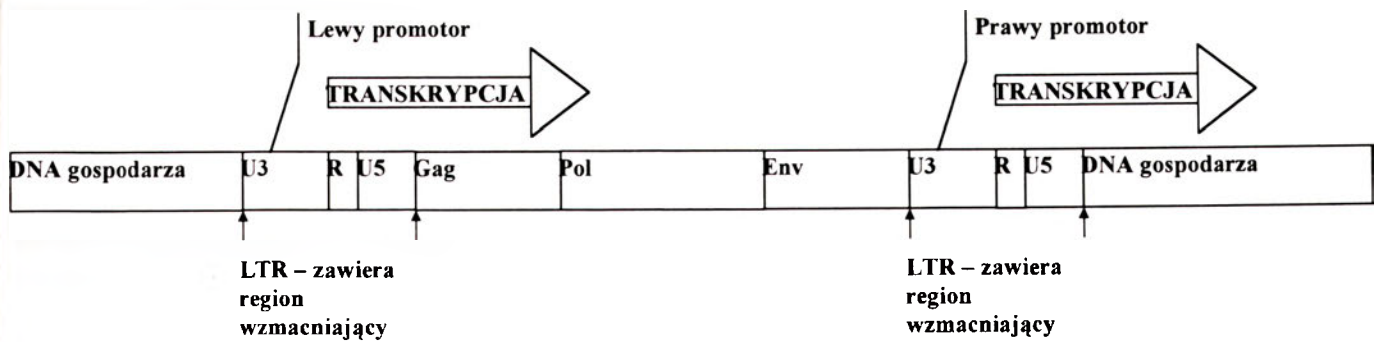
### II. Efekty uboczne związane z wektorem

#### II-1. Insercyjna mutageniza

Zagrożenie to występuje np. przy stosowaniu rekombinowanych retrowirusów, bez wątpienia najbardziej popularnych obecnie wektorów w terapii genowej [1]. Dla zrozumienia mechanizmu insercyjnej mutagenyzy przydatna jest znajomość struktury prowirusa — rycina 1. DNA retrowirusa może poprzez samo swoje wbudowanie w genom komórki-gospodarza „wyciszyć” znajdujący się w miejscu wstawienia (insercji) gen. Ponadto, prawdopodobne jest wzmożenie ekspresji znajdujących się zarówno powyżej (aktywność regionów wzmacniających znajdujących się w długich terminalnych powtórzeniach — LTRs) jak

\* Student, Zakład Genetyki Człowieka PAN, ul. Strzeszyńska 32, 60-479 Poznań





Ryc. 1 Schemat budowy prowirusa

i poniżej miejsca wbudowania (skumulowany efekt obydwu regionów wzmacniających i prawego promotora) [2]. Nie ma powodów aby twierdzić, że insercyjna mutagenaza dotyczy wyłącznie onkogenów i anty-onkogenów. Wręcz przeciwnie, proces ten zachodzi z mniej więcej jednakową częstością w przypadku wszystkich genów. Tym niemniej większość takich zaburzeń, nawet jeśli doprowadzi do śmierci, czy rozregulowania funkcji drobnego ułamka zainfekowanych komórek, nie będzie miała znaczenia dla organizmu jako całości. Groźna będzie natomiast przemiana, którejś z komórek w nowotworową, co może zajść właśnie w drodze „wyciszenia” anty-onkogenów i aktywacji onkogenów [3].

Czy jest możliwa stabilna ekspresja z bardzo niską, czy nawet zupełnie bez insercyjnej mutagenazy? Niewątpliwie tak. Poniżej opisuję niektóre z możliwości.

a) Większość stosowanych obecnie wektorów retrowirusowych to pochodne silnie transformujących szczepów wirusa leukemii mysiej (*high-leukemogenic Moloney Murine Leukemia Virus* — MuLV), zawierających mocny region wzmacniający w regionach LTR. Nie wykorzystywano szczepów słabo transformujących (*low-leukemogenic*) sądząc, że obecny w nich słaby region wzmacniający nie będzie zdolny do stymulacji wydajnej transkrypcji genu terapeutycznego. Niedawno jednak opracowano metodę pozwalającą na ich zastosowanie w strategiach *ex vivo* [4]. Wydajną ekspresję osiąga się po etapie selekcji zmodyfikowanych komórek w obecności neomycyny (wektor oprócz genu terapeutycznego zawiera także gen oporności na analog neomycyny — G418). Podobnego efektu nie obserwuje się w przypadku wektorów opartych na wirusie silnie transformującym. Mechanizm nie jest w pełni poznany, ale przypuszcza się, że selekcja eliminuje komórki z jednym, znacznie zwiększając procentowy udział posiadających dwa lub więcej prowirusów. Rozważa się także możliwość użycia w podobnej procedurze rekombinatów pozbawionych zupełnie regionu wzmacniającego w regionach LTR. Wstępne obserwacje wskazują na zadawalający poziom transkrypcji [5, 6].

b) Możliwość zastosowania rekombinowanego wirusa adenosatelitarnego (ang. *Adeno-Associated Virus* — AAV) omawiałem już w poprzednim artykule. Dodam, że według nowych poglądów wektory na nim

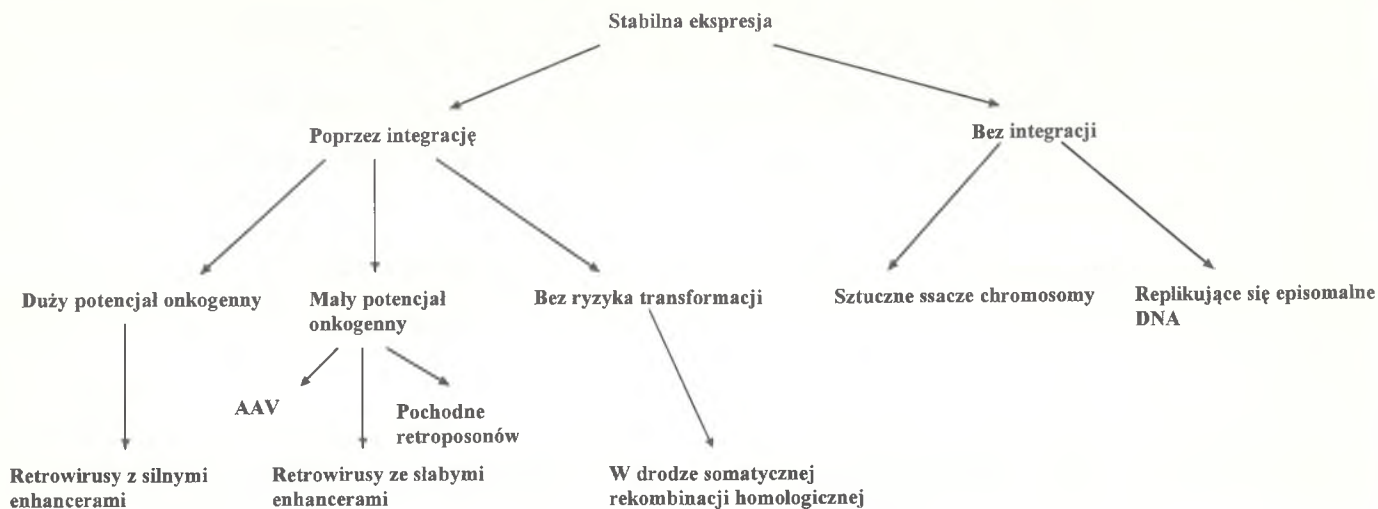
oparte uważa się nie za pozbawione zupełnie potencjału onkogennego, lecz za słabo transformujące [7].

c) Stabilną ekspresję bez insercyjnej mutagenazy zapewnia episomalny DNA pod warunkiem, że jest zdolny do autoreplikacji. Nie chodzi tu o replikację całego wektora (do czego potrzebne są geny kodujące białka otoczki), a tylko o kopiowanie plazmidowego DNA. Przykładem są pochodne bydłowego wirusa *Papilloma* typu pierwszego (*Bovine Papilloma Virus type-1* — BPV-1) [8, 9]. Różnią się one od „dzikiego” wirusa tym, że pozbawiono je regionów onkogennych E5, E6 i E7 oraz genów kodujących białka otoczki L1 i L2. Mimo przeprowadzonych zmian rekombinaty, podobnie jak „dziki” wirus, są zdolne do stabilnej i bardzo wydajnej ekspresji, właśnie dzięki zdolności do powielania się wewnątrz zainfekowanej komórki (średnio do 13-30 kopii). Są to obiecujące wektory, dopuszczone już w USA do prób klinicznych [10].

d) Poznanie minimalnej sekwencji ssaczego centromeru [11, 12] oraz dokładne zidentyfikowanie ssaczych miejsc inicjacji replikacji pozwoli na skonstruowanie sztucznych ludzkich chromosomów (mogłyby one być wprowadzone do komórki za pomocą wektorów o dużej pojemności np. jako kompleksy DNA/liposom czy koniugaty molekularne [13]), które replikując zgodnie z cyklem komórkowym podlegałyby normalnej mitotycznej segregacji.

e) Duże nadzieje wiąże się również z tzw. wirusowymi retropozonomami (ang. *viral superfamily retroposones*) podobnymi do retrowirusów (zdolność do integracji, przechodzenie przez fazy DNA i RNA, produkcja odwrotnej transkryptazy), ale nie mających w swym cyklu życiowym etapu pozakomórkowego [14] (np. w genomie człowieka znajduje się ok. 100 tysięcy elementów L1 zaliczanych do wirusowych retropozonomów [15]). Przypuszcza się, że w czasie ewolucji musiały one wykształcić zdolność do preferencyjnego integrowania się w pewnych miejscach genomu, tak aby nie wywołać insercyjnej mutagenazy. W innym przypadku doprowadziłyby bowiem do wymarcia gatunków, w których się rozwijają.

f) Ogromnym postępem techniki transferu genów byłoby zwiększenie wydajności integracji specyficznej co do miejsca (ang. *site-specific integration*) zachodzącej w drodze somatycznej rekombinacji homologicznej, co umożliwiłoby jej wykorzystanie także w strate-



Ryc. 2 Metody osiągnięcia stabilnej ekspresji

giach *in vivo*. Wiadomo, że w komórkach bakteryjnych proces somatycznej rekombinacji homologicznej stymuluje białko recA oraz będąca trimerem białek recB, recC i recD — endonukleaza recBCD [16, 17]. Przeprowadzony eksperyment (badanie wydajności procesu integracji w drodze somatycznej rekombinacji homologicznej w komórkach modyfikowanych za pomocą liposomów zawierających DNA i białko recA) wykazał jednak brak podobnej aktywności recA w komórkach ludzkich. Postęp w tej dziedzinie uwarunkowany jest zidentyfikowaniem białek odpowiedzialnych za katalizę somatycznej rekombinacji homologicznej w komórkach ssaczych.

Rycina 2 zawiera schematyczny zapis metod osiągnięcia stabilnej ekspresji.

Pocieszający jest fakt, że w praktyce nigdy nie zaobserwowano nowotworzenia w wyniku użycia wektorów retrowirusowych (badania na małpach od 1985 r. i próby kliniczne terapii ludzi od 1990 r.).

W wyjątkowych przypadkach insercyjna mutageniza może nie być związana z żadnym zagrożeniem dla organizmu. Sytuacja taka ma miejsce np. w strategiach dostarczania „genów samobójczych”, przy wprowadzaniu genów kodujących silnie immunizujące antygeny czy stosowaniu genetycznych szczepionek przeciwrakowych. W tych sytuacjach komórki modyfikowane są po prostu eliminowane przez podawanie odpowiedniego leku, reakcję immunologiczną organizmu, ewentualnie (szczepionki przeciwrakowe) „skazane” na obumarciu w krótkim okresie czasu, przez następujące tuż przed wszczepieniem naświetlenie promieniami X (dokładna długość przeżycia zależy od pochłoniętej energii promieniowania i typu nowotworu).

## II-2. Reakcja immunologiczna

Mniej lub bardziej nasiloną reakcją immunologiczną skierowaną jest praktycznie przeciw wszystkim wektorom wirusowym:

a) W przypadku rekombinowanych adenowirusów

odpowiedź immunologiczną wywołują nie tylko wolne wiriony, ale i stransdukowane komórki. Powodowane jest to niską konstytutywną ekspresją późnych genów (zachodzącą mimo nieobecności wczesnego białka E1 działającego jako aktywator transkrypcji późnych genów [18]). Nowa generacja wektorów adenowirusowych, z których oprócz regionu E1 usunięto także E3 (w celu zwiększenia pojemności), stymuluje jeszcze silniejszą reakcję zapalną [19]. Region E3 koduje sześć białek, z których jedno — gp19k jest zdolne do zmniejszania siły reakcji limfocytów T cytotoksycznych. Białko to, zlokalizowane w błonie retikulum endoplazmatycznego, wiąże cząsteczki kompleksu głównych antygenów zgodności tkankowej typu pierwszego (*Major Histocompatibility Complex I* — MHC I), zapobiega ich umiejscowieniu się w błonie plazmatycznej i w ten sposób uniemożliwia prezentowanie za ich pomocą antygenów wirusowych. Pozbawienie wektora zdolności do produkcji białka gp19k wzmacnia zatem reakcję cytotoksyczną. Proponuje się nawet konstruowanie wektorów, w których gen kodujący białko gp19k umieszczony będzie pod kontrolą silniejszego promotora, niż stosunkowo słaby w nieobecności białka E1a promotor regionu E3.

Kwestią sporną jest na ile opisane właściwości immunologiczne adenowirusów ograniczają ich zastosowanie jako wektorów w terapii genowej [7]. Bezpieczniejszą metodą uzyskiwania podobnych wyników (choć z mniejszą wydajnością) jest np. lipofekcja. Tym niemniej wektory adenowirusowe są cały czas drugą (po retrowirusach) najpopularniejszą metodą transferu genów. Ich zwolennicy twierdzą, że obserwowana w praktyce reakcja immunologiczna jest słaba i nie ulega wzmocnieniu w miarę powtarzających się kontaktów z wektorem.

b) Wektory retrowirusowe będące pochodnymi wirusa leukemii mysiej są szybko inaktywowane w krwi ludzkiej (także innych naczelnych, ale nie ulegają inaktywacji w krwi pozostałych ssaków) przez układ dopełniacza. Z tego powodu transfer retrowirusowy może być skuteczny *in vivo* jedynie lokalnie (np.

iniekcja wprost do guza, wlew dokanałowy). Przeszkodę tę planuje się w najbliższym czasie ominąć. Udowodniono już (w warunkach *in vitro*) brak inaktywacji wektora w surowicy ludzkiej w obecności przeciwciał monoklonalnych, dla któregoś z elementów dopełniacza (C1, C2, C3, C5, C6, C8 albo C9), przy czym najlepsze charakterystyki farmakodynamiczne wykazały przeciwciała anty-C5, -C6 i -C8 [20, 21].

c) Białko L1 bydłowego wirusa *Papilloma* typu pierwszego wykazuje silne właściwości antygenowe [10]. Nie jest jeszcze pewne, jak bardzo będzie to ograniczało możliwość zastosowania wektorów opartych na tym wirusie w strategiach *in vivo*.

### II-3. Toksyczność kationowych liposomów

Występuje w czasie terapii *in vivo* wysokimi dawkami tych liposomów. W praktyce podaje się na tyle małe ilości, aby nie występowały żadne objawy toksyczności. Takie ograniczenie dawki oznacza jednak zmniejszenie skuteczności terapii. Opracowuje się nowe liposomy np. DMRIE (dimyristyloxy-propyl-3-dimethyl-hydroxyetyl ammonium)/DOPE (3-N-N'-N'-dimethylamino ethanecarbamoyl cholesterol/dioleoylphosphatidylethanolamine), które wykazują efekty uboczne w wielokrotnie wyższych stężeniach niż liposomy tradycyjnej formuły np. DOTMA (N[1-(2, 3-dioleoyloxy)-propyl]-NNN-trimethyloammonium chloride), DOPSA (2, 3-dioleoyloxy-N-[2(spermincarboxamido)ethyl]-NN-dimethyl-1-propanaminiumtrifluoroacetate). Pozwala to na intensywniejsze leczenie [22].

### II-4. Nabywanie zdolności do replikacji

Podstawową zasadą terapii genowej jest używanie jako wektorów niezdolnych do replikacji pochodnych wirusów. Niestety zarówno w czasie produkcji wektora jak i bezpośrednio w zainfekowanych komórkach może dojść do powstawania rekombinantów zdolnych do replikacji.

a) Rekombinowane adenowirusy. Podstawowym sposobem w jaki osiąga się zablokowanie replikacji w wektorach adenowirusowych jest pozbawienie ich regionu E1 kodującego wczesne białko E1 (regulator transkrypcji, bez którego niemożliwa jest wydajna ekspresja tzw. genów późnych i replikacja wirusa). W czasie produkcji wektora białko E1 dostarczane jest *in trans* przez gen umieszczony uprzednio w genomie komórek linii pakującej (ang. *packaging cell line*). Może jednak dojść do rekombinacji i uzyskania przez wektor zdolności do samodzielnej produkcji białka E1, a zatem i do replikacji [23]. DNA takiej pochodnej wektora będzie oczywiście dłuższe (o gen terapeutyczny) od DNA „dzikiego wirusa”. Ponieważ białkowa otoczka adenowirusa może pomieścić tylko o około 5% więcej DNA niż wynosi długość genomu „dzikiego” wirusa, długość insertu będzie w oczywisty sposób limitowała możliwość powstawania opisanych rekombinatów.

Podobne zjawiska mogą zachodzić *in vivo* w razie przypadkowej koinfekcji „dzikim” adenowirusem. Nawet jeśli nie dojdzie do rekombinacji, taki „dziki” wirus będzie *in trans* dostarczał białka konieczne do replikacji. W konsekwencji nastąpi liza stransdukowanych komórek i rozwój silnego stanu zapalnego.

b) Rekombinowane retrowirusy. Wektor pozbawiony jest regionów gag, pol i env, ma natomiast sygnał pakowania psi. W komórkach linii pakującej znajduje się prowirus zawierający geny gag, pol i env, lecz pozbawiony sygnału pakowania co powoduje, że jego genomowe transkrypty nie mogą być opłaszczane przez białka wirusowego rdzenia. Do rekombinacji może dojść zarówno na poziomie DNA, jak i RNA. Cykl życiowy tych wirusów zachodzi, co prawda, bez lizy zainfekowanych komórek, ale rozwój retrowirusów zdolnych do replikacji oznacza zwiększenie intensywności insercjonalnej mutagenyzy, a co za tym idzie wzrost ryzyka nowotworzenia [24]. Przyczyną jest nie tylko infekowanie komórki przez większą liczbę wirionów, ale także wielokrotne wewnątrzkomórkowe cykle: odwrotna transkrypcja — integracja — transkrypcja zachodząca dla genomów każdego z nich. W nowych generacjach komórek pakujących zmniejsza się ryzyko powstania wirusów zdolnych do replikacji przez zwiększenie minimalnej liczby koniecznych do tego rekombinacji (np. umieszczając regiony gag, pol, env oddzielnie w różnych miejscach genomu) [1].

Opracowano szereg testów służących zarówno kontroli jakości wektorów przed ich użyciem (szczególnie w próbach klinicznych), jak i stwierdzeniu ewentualnej obecności wirusów zdolnych do replikacji we krwi pacjentów. Przykłady to: PG4S + L-Assay, Mus dunni i NIH3T3 Cells Co-Cultivation Studies dla wykrywania zdolnych do replikacji retrowirusów oraz A549-Assay i PCR ze starterami specyficznymi dla genu E1 stosowane w celu stwierdzenia obecności adenowirusów mogących się samodzielnie replikować.

## III. Efekty uboczne związane z genem terapeutycznym

Niesposób w tak krótkim artykule zasygnalizować choćby ewentualną toksyczność związaną ze wszystkimi możliwymi genami terapeutycznymi. Każda choroba dziedziczna wymaga transferu innego genu. W przypadku nowotworów i infekcji wirusem *Human Immunodeficiency Virus* (HIV) już dzisiaj stosuje się kilkanaście różnych genów terapeutycznych. Poniżej podaję jedynie dwa przykłady.

### III-1. Toksyczność cytokin

Inspiracją dla prób z tzw. genetycznymi szczepionkami przeciwnowotworowymi było niepowodzenie programów układowej terapii interleukiną 2 (IL-2) [10]. Przypuszcza się, że krótkotrwałość takiej terapii (wymuszona szybkim rozwojem objawów toksyczno-

ści) jest najpoważniejszym czynnikiem ograniczającym jej skuteczność. Przewagą genetycznych szczepionek ma być większa specyficzność indukowanej odpowiedzi immunologicznej oraz mniejsze efekty uboczne (miejscowo tylko wysokie stężenie interleukin). Początkowo używano genu IL-2, obecnie próbuje się także stosować geny wielu innych cytokin (np. IL-4, IL-5, IL-6, IL-12, TNF, interferony) [25]. Dotychczasowe wyniki (próby kliniczne fazy I) wskazują na minimalną toksyczność, ale i znikomą aktywność biologiczną.

### III-2. Problem strategii antysensu

Jeśliby używać genu terapeutycznego, którego transkrypty hybrydują z mRNA genu docelowego na całej długości sekwencji kodującej oraz stosować metodę transferu prowadzącą do integracji genu terapeutycznego z DNA gospodarza, to przy przypadkowym wbudowaniu się w małej odległości poniżej jakiegoś promotora, mogłyby powstawać transkrypty sensowne w stosunku do genu docelowego. Terapia dawałaby wtedy skutki dokładnie odwrotne niż zamierzone (np. jeśli genem docelowym byłby onkogen, zamiast hamować rozwój nowotworu mogłaby stymulować jego wzrost). Ponadto długie antysensowne RNA są paradoksalnie mniej selektywne, gdyż często mogą hybrydować tylko fragmentami swojego łańcucha (zjawisko wykorzystywane np. w technice PCR z arbitralnymi starterami [51]). Zatem w strategii antysensu selektywność i wydajność wyciszania zapewniają odcinki 8-15 nukleotydowe, najlepiej projektowane ze znajomością struktury trzeciorzędowej przyjmowanej przez dany mRNA i takie powinno się stosować w terapii genowej [7].

## IV. Inne niepożądane zjawiska

### IV-1. Przedostanie się nowych odmian wirusów do środowiska

Rekombinaty w takiej sytuacji mogłyby być albo samodzielnymi, zdolnymi do replikacji wirusami (najbardziej prawdopodobne w przypadku wektorów adenowirusowych), albo utrzymywać się w środowisku jako wirusy defektywne, do replikacji wymagające koinfekcji odpowiedniego „dzikiego” wirusa.

Specjalne środki ostrożności podejmuje się na przykład przy terapii mukowiscydozy, kiedy zachodzi możliwość przenoszenia się rekombinowanych adenowirusów drogą kropelkową (celem transferu genów są komórki nabłonka dróg oddechowych). W przypadku zastosowania wektora adenowirusowego techniką PCR można stwierdzić jego obecność w nozdrzach pacjentów do pięciu dni od momentu podania. Przez ten czas pacjenci nie mogą opuścić szpitala, przebywają w izolacji i noszą specjalne maski [7].

Ostatnio, właśnie dla mukowiscydozy, Doradczy

Komitet ds. Rekombinowanego DNA (ang. *Recombinat DNA Advisory Committee* — RAC) zatwierdził pierwszy na terenie USA program wykorzystujący jako wektor rekombinowany AAV. AAV jest bardzo odporny na niekorzystne warunki (co wykorzystuje się np. przy produkcji opartych na nim wektorów eliminujących zanieczyszczenia pomocniczymi adenowirusami metodą termiczną). Badania przedkliniczne (technika PCR) wykazały utrzymywanie się wektora w drogach oddechowych zwierząt laboratoryjnych do 21 dni po infekcji. RAC zatwierdził próby kliniczne pod warunkiem przedłużonej izolacji pacjentów oraz wykorzystywania do dezynfekcji tzw. roztworu wybielającego (ang. *bleach solution*) szczególnie aktywnego wobec AAV [7].

Trzeba przyznać, że mało prawdopodobne jest utrzymanie na wszystkich poziomach pracy z wektorem (produkcja, próby na zwierzętach, próby kliniczne) środków ostrożności dających pewność całkowitej kontroli jego rozprzestrzeniania się. Można jednak również wątpić czy ewentualna „ucieczka” rekombinowanych wirusów miałyby jakiegokolwiek niekorzystne skutki. Manipulacje dokonywane na wirusach w terapii genowej zmierzają przeciw do eliminacji ich patogenności. Jako gen terapeutyczny (także markerowy czy selekcyjny) nie są wykorzystywane geny oporności na leki przeciwwirusowe. Pewności oczywiście mieć nie można. Ryzyko takie jest zresztą problemem raczej całej biotechnologii niż tylko terapii genowej. Warto przypomnieć jak wielkie były obawy, kiedy dokonywano pierwszych manipulacji genetycznych na bakteriach. Dzisiaj rekombinacja bakteryjnego DNA, biblioteki cDNA, tworzenie map fizycznych za pomocą klonów w sztucznych chromosomach drożdży (*Yeast Artificial Chromosomes* — YAC) jest codzienną praktyką. Szeroko stosuje się rozmaite geny oporności na (często używane również w medycynie) antybiotyki. Podejmowane środki ostrożności służą bardziej ochronie przed zakażeniem hodowli niż zabezpieczeniu się przed „ucieczką” z laboratorium rekombinantów [26].

### IV-2. Warunki hodowli *in vitro*

Produkcja wszystkich wektorów wirusowych przechodzi przez etap hodowli komórkowej *in vitro*. Łatwo wtedy o zakażenie mikrobiologiczne. Oczywiście zatem jest konieczność zachowania najwyższej sterylności. Produkcja winna mieć miejsce w specjalnym pokoju hodowlanym. Personel powinien używać rękawiczek i masek. Osoby zakaźnie chore i bezobjawowi nosiciele nie powinni pracować przy hodowlach *in vitro*. W celu produkcji wektorów dla prób klinicznych nie można używać pożywek opartych na surowicy bydłej, tylko na surowicy ludzkiej (konieczne są negatywne wyniki testów ELISA na obecność przeciwciał dla wirusów zapalenia wątroby typu A, B i C oraz HIV). Jeszcze lepsze są dokładnie chemicznie zdefiniowane pożywki

bez surowicy (ang. *serum-free media*).

W praktyce wektory dla prób klinicznych zazwyczaj przygotowywane są przez wyspecjalizowane w terapii genowej firmy biotechnologiczne (np. *Genetic Therapy Incorporation* — GTI, Viagene, Genzyme), niekiedy tylko przez uniwersytety [30].

#### IV-3. Zanieczyszczenie lipopolisacharydem plazmidowego DNA izolowanego z *E. coli*

W niektórych przypadkach (mięśnie szkieletowe [31], mięsień serca [32], hepatocyty [33]) skuteczną metodą wywołania przejściowej ekspresji genu terapeutycznego może być prosta iniekcja roztworu plazmidowego DNA. Tę szczególną właściwość tłumaczy się specyficzną strukturą w/w tkanek. W czasie prowadzenia prób przedklinicznych zaobserwowano jednak układową toksyczność zależną od wysokości dawki DNA. Dokładne badania wykazały zanieczyszczenie izolowanego z hodowli *E. coli* plazmidowego DNA lipopolisacharydem (LPS). Analogiczny problem występuje przy stosowaniu kompleksów liposom + plazmidowy DNA. LPS jest silnym adjuwantem i mitogenem dla limfocytów. Stymuluje syntezę cytokin i innych mediatorów reakcji zapalnej [34-36]. Żadna z tradycyjnych metod izolowania plazmidu nie zapewnia oczyszczenia DNA z lipopolisacharydu. Na potrzeby terapii genowej opracowano nową procedurę zmniejszającą 10 000 razy zanieczyszczenie LPSem w porównaniu do dotychczas stosowanych [37]. Obejmuje ona przeprowadzenie bakterii w sferoplasty w środowisku hypotonicznym, inkubację z lizozymem i następnie n-octylo- $\beta$ -D-tioglukopyranozydem (niejonowy detergent) oraz chromatografię na kolumnie wypełnionej polimyksyną B.

#### IV-4. Iniekcje komórek produkujących wektor

W programach terapii za pomocą strategii HSV-tk/gancyklowir przewidujących podawanie pacjentom mysich komórek produkujących wektor retrowirusowy (linia PA317-G1Tk1SvNa — GTI) obserwowano znaczące objawy toksyczności tuż po iniekcji w/w komórek (np. ból głowy, nadciśnienie, zapalenie opon mózgowych, infekcje bakteryjne). Choć nie ma jeszcze całkowitej pewności przyczyną może być, albo zanieczyszczenie komórek będące błędem w produkcji, albo brak tolerancji ludzkiego organizmu na mysie komórki [38].

#### IV-5. Zabiegi towarzyszące

Terapia genowa wymaga często towarzyszących drobnych zabiegów chirurgicznych (np. iniekcje, biopsje, wlewy dokanałowe, dożylnie itp.). Są one standardowo wykonywane nie tylko na potrzeby terapii genowej i nie stwarzają znaczącego niebezpieczeństwa.

Liczne programy związane ze strategią HSV-tk/

gancyklowir wymagają systemicznego podawania gancyklowiru (preparat cytovene). Stosuje się wlewy dożylnie zazwyczaj po siedmiu dniach od infekcji, przez dwa tygodnie. W USA gancyklowir podaje się w celu leczenia oportunistycznego zakażenia wirusem cytomegalii u chorych na AIDS. Podaje się wtedy bardzo wysokie dawki przez długi okres czasu. U 40% pacjentów obserwuje się granulocytopenię, 20% trombocytopenię u 2% inne objawy uboczne jak anemia, gorączka, wyprysk skórny. W programach terapii genowej stosuje się jednak niższe dawki przez zaledwie dwa tygodnie. Nie obserwuje się wtedy analogicznych powikłań. Tym niemniej podając gancyklowir regularnie kontroluje się morfologię krwi pacjentów [39].

W niektórych programach wykorzystuje się zwiększenie stymulacji apoptozy w komórkach nowotworowych, do których wprowadzono antyonkogen p53, pod wpływem cytostatyku cisplatyny. Cisplatyna jest nowoczesnym chemioterapeutykami nie pozbawionym jednak toksyczności. Często występują silne nudności i wymioty, które tłumi się blokując jeden z receptorów dla 5-hydroksy-tryptaminy (serotoniny) mianowicie 5-HT<sub>3</sub>, np. za pomocą ondasteronu (preparat Zofran), czy tropisetronu (preparat Navoban) [40, 41]. Ponadto dla zmniejszenia skutków nefrotoksyczności cisplatyny konieczne jest nawadnianie oraz wymuszona diureza.

W prowadzonych obecnie próbach leczenia zaawansowanego raka sutka i jajnika [42] polegających na umożliwieniu intensyfikacji leczenia chemioterapeutykami dzięki uprzedniemu zabezpieczeniu komórek szpiku poprzez wprowadzenie do nich genu oporności wielolekowej (*multiple drug resistance type 1* — MDR-1), podawanym lekiem jest taksol, jedno z najnowszych osiągnięć badań nad cytostatykami [40, 41]. Najpoważniejszą toksyczność wykazuje on właśnie w stosunku do szpiku kostnego. Jest efektywnie usuwany z wnętrza komórek przez, działającą na zasadzie pompy ATP zależnej, glikoproteinę p-170 (produkt ekspresji genu MDR-1), a jego niszczące działanie w stosunku do raka sutka i jajnika jest silne i wzrasta proporcjonalnie do dawki [43]. W opisywanych programach stosuje się specjalne algorytmy prowadzenia terapii. W kolejnych cyklach podawania taksolu (w odstępie miesiąca) zwiększa się stopniowo dawkę przechodząc od objawów ubocznych lekkich i średnich, do ciężkich, kiedy zaprzestaje się zwiększania dawki. Dopiero efekty uboczne zagrażające życiu oznaczają konieczność zmniejszania ilości podawanego taksolu, zaś ich utrzymywanie się mimo zmniejszenia dawki do minimalnej zaprzestania chemioterapii.

W wielu programach modyfikacji genetycznej dokonuje się w trakcie autologicznego przeszczepu szpiku kostnego. Przeszczep taki, choć bezpieczniejszy od allogenicznego, stwarza wiele możliwości powikłań. Po pobraniu pewnej ilości szpiku, resztę eliminuje się za pomocą chemioterapii myeloablacyjnej. Stosuje się

związki alkilujące (np. cyklofosfamid albo melfalan) z równoczesnym napromieniowaniem całego ciała, bądź samodzielnie (cyklofosfamid jednocześnie z tiotepą). Związki alkilujące są najbardziej toksycznymi i mutagennymi cytostatykami, jednak tylko one są w stanie zniszczyć wielopotencjalne komórki macierzyste szpiku (90% tych komórek znajduje się w fazie Go). Inne cytostatyki uszkadzają przede wszystkim populację komórek proliferujących (wstępnie zróżnicowane komórki prekursorowe poszczególnych układów hemopoetycznych). W kolejnym etapie wstrzykuje się dożylnie zmodyfikowane genetycznie komórki szpiku. Przez okres 3-4 tygodniowej rekonstrukcji układu krwiotwórczego, konieczne jest specjalne postępowanie osłaniające: podawanie antybiotyków, leków przeciwgrzybiczych, przeciwwirusowych, masy płytkowej i erytrocytarnej, osocza, czynników przyspieszających odnowę szpiku (czynnika stymulującego wzrost kolonii granulocytów i makrofagów — GM-CSF, czynnika stymulującego wzrost kolonii granulocytów G-CSF, erytropoetyny). Sumarycznie prawdopodobieństwo zgonu w wyniku toksyczności agresywnej chemioterapii, niewydolności przeszczepu i sepsis wynosi ok. 5% [44-48].

## V. Uwagi końcowe

Próby kliniczne znajdują się pod najlepszą kontrolą w USA (tam też przeprowadza się ich najwięcej). Prowadzący mają obowiązek zgłaszać obserwowane efekty uboczne Food and Drug Administration oraz lokalnym agendom kontroli medycznej. Ponadto informacje te drukowane są na łamach *Human Gene Therapy*. Według tych danych nie dość, że objawy uboczne związane bezpośrednio z transferem genów obserwuje się u niewielu pacjentów, to w większości są one lekkie i nie wymagają przerwania terapii. Należy jednak pamiętać, że obserwacje te prowadzone są jak na razie zbyt krótko, aby mieć pewność, że zauważono wszystkie efekty uboczne.

Ważne jest, aby zdać sobie sprawę jak wiele efektów ubocznych powodują konwencjonalne metody terapii. Uważa się, że nie ma w ogóle leków nietoksycznych. Oto kilka informacji dotyczących tylko jednej grupy leków. Cytostatyki powszechnie stosowane w leczeniu nowotworów powodują u średnio 5-10% pacjentów objawy toksyczności zagrażającej życiu, prowadząc do śmierci w około 0.5% przypadków. Statystycznie potwierdzono, że przejście chemioterapii (szczególnie związkami alkilującymi) lub, co jeszcze gorsze, skojarzonego leczenia cytostatykami i radioterapii zwiększa ryzyko rozwoju następnego nowotworu. Ponadto chemioterapia jest najczęściej leczeniem systemicznym i na mutagenny wpływ cytostatyków narażone są także komórki linii zarodkowej. Ponieważ pierwsze doświadczenia z iperytem azotowym miały miejsce dopiero w 1946 r. dzisiaj niesposób jeszcze ocenić wpływ cytostatyków na zdrowie następnych pokoleń. Wiedza

teoretyczna każe jednak spodziewać się częstszych wad rozwojowych i zachorowań na nowotwory [49, 50].

Obecny etap rozwoju terapii genowej całkowicie uzasadnia próby jej stosowania w najcięższych chorobach człowieka. W przyszłości, dzięki spodziewanemu postępowi (szczególnie w technikach wprowadzania genów do komórek) można ją będzie prawdopodobnie bez większych obaw stosować wszędzie tam, gdzie transfer genów może mieć znaczenie terapeutyczne.

Artykuł otrzymano 22 sierpnia 1995 r.

Zaakceptowano do druku 23 listopada 1995 r.

## Piśmiennictwo

1. Salomons B, Gunzburg WH (1993) *Hum Gene Ther* 4: 129-141
2. Levin B (1994) W: *Genes V*, Ch. 35, Oxford Press, New York
3. Harłodzińska-Szmyrka (1995) *Post Biochem* 41: 7-14
4. Duch M, Paludan K, Lovmand J (1995) *Hum Gene Ther* 6: 289-96
5. Pedersen K, Lovmand S, Jorgenson ECB (1992) *Virology* 187: 821-824
6. Sablitsky F, Jonsson J, Cohen BL, Phillips RA (1993) *Cell Growth Diff* 4: 451-459
7. Strans, Dronamraju, Samulski, Flotte (1995) *Hum Gene Ther* 6: 481-525
8. One Y, Zhao D, Saijo N (1995) *Hum Gene Ther* 6: 325-333
9. Karasuyama J, Melchers F (1998) *Eur J Immunol* 18: 97-104
10. Cassileth PA, Podack E, Sridhar K, Savaraj N (1995) *Hum Gene Ther* 6: 369-383
11. Mitchell A, Jeppesen P, Hanratty D (1992) *Chromosoma* 101: 333
12. Tyler-Smith C, Oakey RJ, Larin Z, Crocker M (1993) *Nat Genetics* 5: 368-372
13. Miller N, Vile G (1995) *FASEB J* 2: 190-199
14. Howe, Berg (1989) W: *Mobile DNA*, Amer Soc for Microbiol
15. Kwiatkowska J, Trzeciak T, Słomski R (1995) *Post Biochem* 41: 15-22
16. West (1992) *Ann Rev Biochem* 61: 603-640
17. Lewin B (1994) W: *Genes V*, Ch. 33, Oxford Press, New York
18. Brody SL, Metzger M, Danel C, Crystal RG (1994) *Hum Gene Ther* 5: 821-836
19. Zsengeller KZ, Wert SE (1995) *Hum Gene Ther* 6: 457-467
20. Rother RP, Squinto SP, Mason JM, Rollins SA (1995) *Hum Gene Ther* 6: 429-435
21. LoBuglio AF, Wheeler RH, Trang J, Haynes A (1989) *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 4220-4224
22. San H, Yang Z, Jaffe ML (1993) *Hum Gene Ther* 4: 781-788
23. Lochmuller H, Jani A (1994) *Hum Gene Ther* 5: 1485-1493
24. Donahue RE, Kesler SW, Bodine D, McDonagh K, Dunbar C, Goodman S (1992) *J Exp Med* 176: 1125-1135
25. Simons JW et al. (1995) *Human Gene Ther* 6: 347-368
26. Anderson WF (1995) *Human Gene Ther* 6: 1-3
27. Electricwala (1987) W: *Biotechnology in Clinical Medicine* 115-125, Raven Press, New York
28. Bagnarelli P, Clementi M (1987) W: *Vertebrate Cell Culture* 85-95, Akademie-Verlag Berlin
29. Bjare U (1987) W: *Vertebrate Cell Culture* 95-109, Akademie-Verlag Berlin
30. Walters LeRoy (1995) *Human Gene Ther* 6: 535-546
31. Ulmer JB, Donnelly JJ, Parker SE, Rhodes GH, Felyner PL, Dvarki VJ, Deck R, Dewitt C (1993) *Science* 259: 1745-1749
32. Gal D, Weir L, Leclerc G, Pickering JG, Hogan J, Inzer JM (1993) *Lab Invest* 68: 18-25
33. Hickman MA, Malone RW, Sih TR, Knoell D,

Szoka FC, Walzem R (1994) *Human Gene Ther* 5: 1477-1485

34. Morrison DC, Ryan JL (1987) *Ann Rev Med* 38: 417-432
35. Bone RC (1991) *Ann Int Med* 115: 457-469
36. Bayston KF, Cohen J (1990) *Med Microbiol* 31: 73-83
37. Wicks IP, Howell ML, Hancock T, Kohsaka H, Olee T, Carson DA (1995) *Human Gene Ther* 6: 317-323
38. Berger M, Marcus S (1995) *Human Gene Ther* 6: 527-532
39. Oldfield HE, Ram Z, Chiang Y, Blease RM (1995) *Human Gene Ther* 6: 55-87
40. Madej G (1992) *Problemy* 9: 44-50
41. Madej G (1994) W: Chemioterapia onkologiczna dorosłych i dzieci, PZWL, Warszawa
42. Sikora K (1995) *Gene Therapy* 2: 233-234

43. Rovinsky EK (1992) *Contemp Oncol* 3: 29-31
44. Fenton RT, Sznol M, Luster DG, Tanb DP, Longo DL (1995) *Human Gene Ther* 6: 87-107
45. Gutati S (1992) *J Clin Oncol* 10: 936
46. Petersen JB (1990) *J Clin Oncol* 8: 638
47. Singer JW (1992) *Sem Oncol* 19 (suppl.): 7-27
48. Skotnicki AB, Jurczak WJ (1994) W: GM-CSF właściwości i zastosowania kliniczne, Kraków
49. Perry MC (1992) W: The Chemotherapy Source Book 548-552, 498-507 Williams & Wilkins
50. Mulvihill JJ (1987) *Cancer* 60: 1143-1150
51. Caetano-Anolles G (1993) *PCR Methods and Applications* 3: 85-94

## Naprawa O<sup>6</sup>-Metyloguaniny w DNA

### Repair of O<sup>6</sup>-Methylguanine-DNA

EWA ŚLEDZIEWSKA-GÓJSKA\*

Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Metylotransferazy O<sup>6</sup>-metyloguaniny-DNA
  - II-1. Białko Ada i odpowiedź adaptacyjna u *E coli*
  - II-2. Inne metylotransferazy O<sup>6</sup>-metyloguaniny-DNA pro- i eukariotyczne
- III. Alternatywne systemy reperacji O<sup>6</sup>-metyloguaniny w DNA
- IV. Podsumowanie

**Wykaz stosowanych skrótów:** MGMT — metylotransferaza O<sup>6</sup>-metyloguaniny-DNA; MNNG — *N*-metyl-*N'*-nitro-*N*-nitrozoguanidyna; MNU — *N*-metyl-*N*-nitrozomocznik; MMS — metanosulfonian metylowy; DMS — dwumetylosiarczan; O6mG — O<sup>2</sup>-metyloguanina; O4mT — O<sup>4</sup>-metylotymina; mPTs — Sp diastereoizomery wiązań metylofosforójtęstrowych.

#### Wstęp

Związki alkilujące działają toksycznie i mutagennie a u ssaków mogą wywoływać proces transformacji nowotworowej. Badania ostatnich trzydziestu lat wiążą wszystkie te efekty z alkilacją DNA.

Reakcja związków alkilujących z DNA prowadzi do powstania kilkunastu modyfikacji [1]. Elektrofilowy atom węgla grupy alkilowej może reagować praktycznie ze wszystkimi dostępnymi heteroatomami azotu i tlenu stanowiącymi centra nukleofilowe w DNA. Nie można wykluczyć udziału żadnej z tych modyfikacji w biologicznym efekcie związków alkilujących, jednakże wydaje się, że szczególną rolę w powstawaniu

Contents:

- I. Introduction
- II. O<sup>6</sup>-methylguanine-DNA-methyltransferases
  - II-1. Ada protein and adaptive response in *E. coli*
  - II-2. Other pro-and eucaryotic O<sup>6</sup>-methylguanine-DNA methyltransferases
- III. Alternatywne pathways of the repair of O<sup>6</sup>-methylguanine-DNA
- IV. Summary and conclusions

mutacji oraz inicjacji transformacji rakowej a także pewną rolę w toksycznym efekcie związków alkilujących odgrywa O<sup>6</sup>-metyloguanina.

Już w 1969 r. Lovless i wsp. zaproponowali, że O<sup>6</sup>mG jest uszkodzeniem premutagennym wskazując na teoretyczną możliwość tworzenia w DNA pary O6mG: tymina [2]. Badania dyfrakcji promieni X potwierdzają, że para O6mG:T odpowiada geometrii par Watson'a Crick'a [3]. I choć inne badania fizykochemiczne wskazują na mniejszą stabilność O6mG:T w stosunku do par nukleotydowych naturalnie występujących w DNA uważa się, że premutagenny charakter O<sup>6</sup>-metyloguaniny wiąże się z tendencją polimerazy do odczytywania tej zmodyfikowanej zasady jako adeniny [4].

Badania replikacji DNA *in vitro* potwierdzają, że zarówno inkorporacja trójfosforanu O<sup>6</sup>-metylodeзокsyguanozyny jak i replikacja matrycy zawierającej O6mG prowadzi do tworzenia par O6mG:T [5,6]. Przypieczeniem hipotezy mutagennego działania O6mG *in vitro* są wyniki doświadczeń mutagenyzy sterowanej pokazujące, że O<sup>6</sup>-alkiloguanina wstawiona w ściśle określone miejsce genu powoduje powstanie w tym miejscu tranzykcji G→A [7-9]. Tak więc

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

z jednej strony wyniki powyższych doświadczeń potwierdzają, że obecność O6mG w DNA może prowadzić do tranzycji GC→AT, z drugiej strony badanie spektrum mutacji pokazuje, że tranzycje GC→AT stanowią dominującą klasę pośród mutacji indukowanych przez związki alkilujące. Dla silnych mutagenów jak *N*-metyl-*N*-nitrozomocznik (MNU) czy *N*-metylo-*N'*-nitro-*N*-nitrozoguanidyna (MNNG) GC→AT stanowią ponad 98% indukowanych mutacji [10-12]. Można przedstawić wprost proporcjonalną zależność pomiędzy ilością O6mG w DNA a częstością mutacji indukowanych przez dany związek [13].

Silne mutageny jak MNU, MNNG czy powstające endogennie alkilnitrozoaminy są także silnymi kancerogenami. Wykazano, że inicjacja transformacji nowotworowej przez związki tego typu może zachodzić poprzez mutagenną aktywację onkogenu *ras* w wyniku tworzenia O6mG w DNA [14, 15]. Tak więc reperacja O6mG w DNA wydaje się być istotnym czynnikiem modulującym mutageny i kancerogeny, a także w pewnym stopniu toksyczny efekt działania związków alkilujących.

## II. Metylotransferazy O<sup>6</sup>-metyloguaniny-DNA (E. C. 2.1.1.63)

Główna droga reperacji O6mG w DNA wykorzystuje metylotransferazę O<sup>6</sup>-metyloguaniny (MGMT). Aktywność MGMT odkryto w komórkach wszystkich dotychczas zbadanych organizmów począwszy od bakterii przez niższe eukarionty aż do człowieka.

### II-1. Białko Ada i odpowiedź adaptacyjna w *Escherichia coli*

Kiedy komórki *E. coli* traktowane są małymi, subletalnymi, dawkami środków alkilujących wzrasta ich odporność zarówno na mutagenne jak i toksyczne działanie tych związków. To odkryte w końcu lat siedemdziesiątych zjawisko nazwane zostało odpowiedzią adaptacyjną [16]. Pierwszą aktywnością, którą zauważono w zaadaptowanych komórkach *E. coli* było gwałtowne usuwanie O6mG z DNA [17]. Aktywność ta związana jest z białkiem Ada, produktem genu *ada*, pełniącym centralną rolę w odpowiedzi adaptacyjnej.

Ada, określana także jako MgtI, jest białkiem o wielkości 39 kDa i składa się z dwóch funkcjonalnie różnych domen, N- i C-terminalnej, połączonych rejonem łącznikowym wrażliwym na proteazy (Ryc. 1). Zarówno całe białko Ada jak i powstająca w wyniku proteolizy jego część C-terminalna są zdolne do równie szybkiej i wydajnej ( $10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ) reperacji DNA zawierającego O6mG [18, 19]. Mechanizm tej reperacji jest unikalny pośród znanych dotychczas systemów reperacyjnych. Grupa metylowa z pozycji O<sup>6</sup> guaniny przenoszona jest na aktywną cysteinę wewnątrz cząsteczki MGMT. Wynikiem tej reakcji jest regeneracja

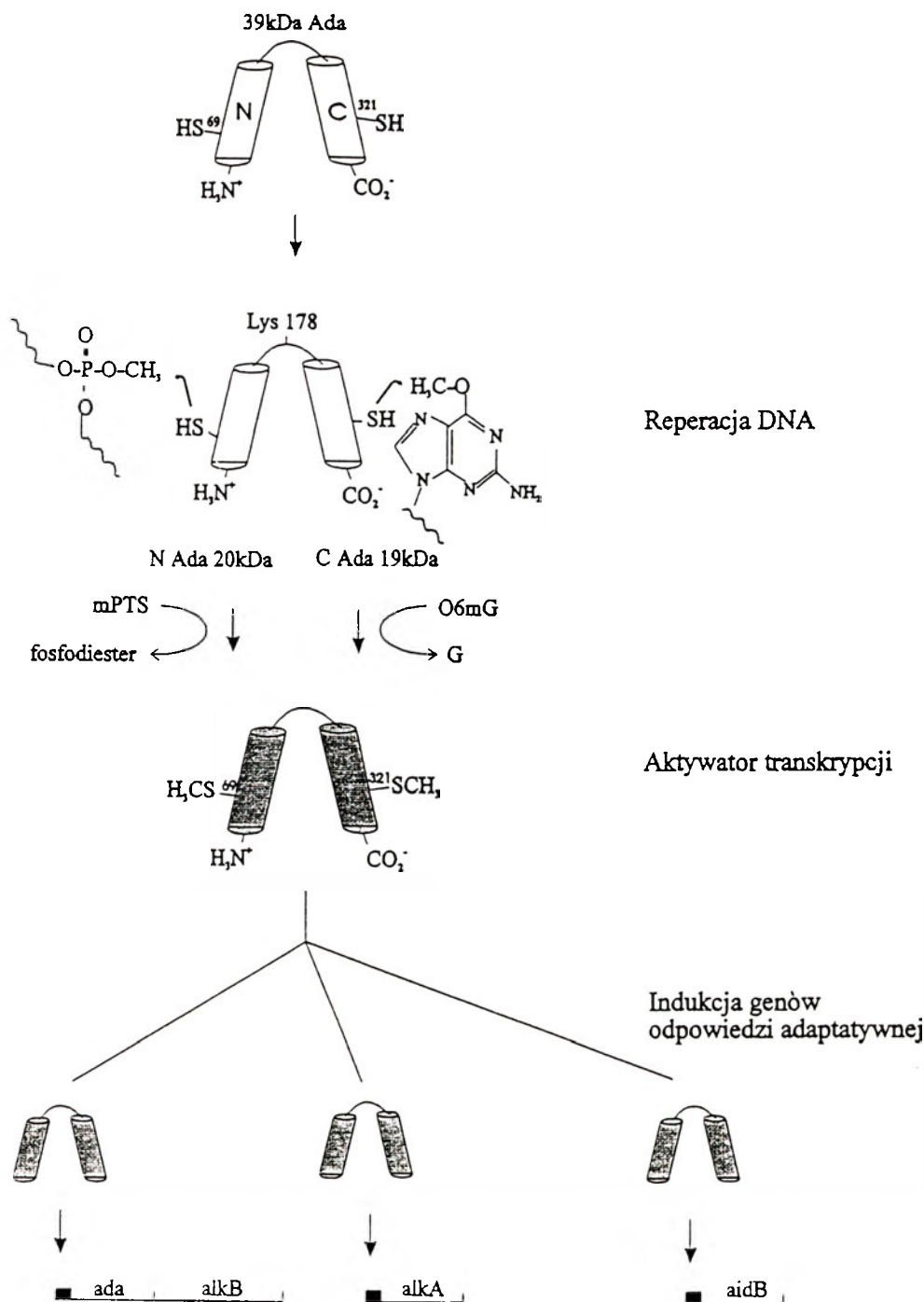
nieuszkodzonej guaniny w DNA i nieaktywne białko, w którym grupa tiolowa aktywnej cysteiny zablokowana jest przez grupę metylową [20]. Reakcja ta jest nieodwracalna — nie znaleziono dotychczas żadnego systemu *in vivo* lub *in vitro*, który pozwoliłby na regenerację cysteiny z metylcysteiny powstającej w obrębie MGMT. Tak więc Ada nie jest prawdziwym enzymem, reaguje z DNA stechiometrycznie i poziom aktywności MGMT zależy od liczby jej cząsteczek w komórce.

Badania mechanizmu przeniesienia grupy metylowej z O6mG na aktywną cysteinę białka Ada, z wykorzystaniem analogów guaniny niosących siarkę lub selen zamiast tlenu przy szóstym węglu, potwierdzają klasyczny, stymulowany kwasem, SN2 charakter tej reakcji [21]. Proponowany jest równoczesny transfer protonu z centrum aktywnego MGMT na tlen i nukleofilowy atak grupy tiolowej cysteiny na węgiel grupy metylowej.

W obrębie białka Ada znajduje się dwanaście reszt cysteinowych, akceptorem grupy metylowej z O6mG jest grupa SH cysteiny w pozycji 321 [22,23]. Ponad osiemdziesięcioaminokwasowy rejon otaczający aktywną cysteinę jest silnie konserwowany ewolucyjnie, a sekwencja ProCysHisArg<sup>Val/Ile</sup> zawierająca miejsce akceptorowe występujące we wszystkich znanych MGMT (Ryc. 2). Rola poszczególnych aminokwasów tej sekwencji była badana dla Mgt2 produktu genu *ogt*, drugiej obok białka Ada MGMT obecnej w komórkach *E. coli* [24]. Mutagenesa sterowana prowadząca do powstania zmutowanych cząsteczek MgtII niosących różne aminokwasy w obrębie sekwencji kanonicznej, a także analiza funkcjonalnych rewertantów tych mutacji potwierdza, że sekwencja ProCysHisArg jest warunkiem *sine qua non* aktywności metylotransferazy O<sup>6</sup>-metyloguaniny. Walina znajdująca się zarówno w otoczeniu Cys<sub>321</sub> jak i w sekwencji akceptorowej cząsteczek MgtII może być zastąpiona przez szereg aminokwasów, a co najmniej cztery z nich: Ile, Cys, Leu i Ala dają wartości zbliżone do oryginalnej Val jeśli chodzi o aktywność MGMT i reakcje z przeciwciałami.

Ostatnio rozwiązano strukturę krystaliczną 178-aminokwasowej C-terminalnej części białka Ada, odpowiedzialnej za aktywność MGMT [25]. Białko to określone przez autorów jako AdaC składa się z dwóch różnych strukturalnie domen. 88-aminokwasowy fragment N-końca przypomina strukturę RNA-zy H. Domena C-terminalna tego polipeptydu obejmująca pozostałe 90 aminokwasów zawiera szereg struktur  $\alpha$ -helikalnych powiązanych luźnymi pętlami, część z nich przypomina motyw helix-turn-helix. Motyw ten, zwykle odpowiedzialny za wiązanie z DNA leży jednak daleko od akceptorowej sekwencji ProCysHisArgVal i może być związany raczej z niespecyficznym wiązaniem się białka z DNA niż ze specyficznym oddziaływaniem MGMT z O6mG. Aktywna cysteina nie znajduje się zgodnie z oczekiwaniem na powierzchni



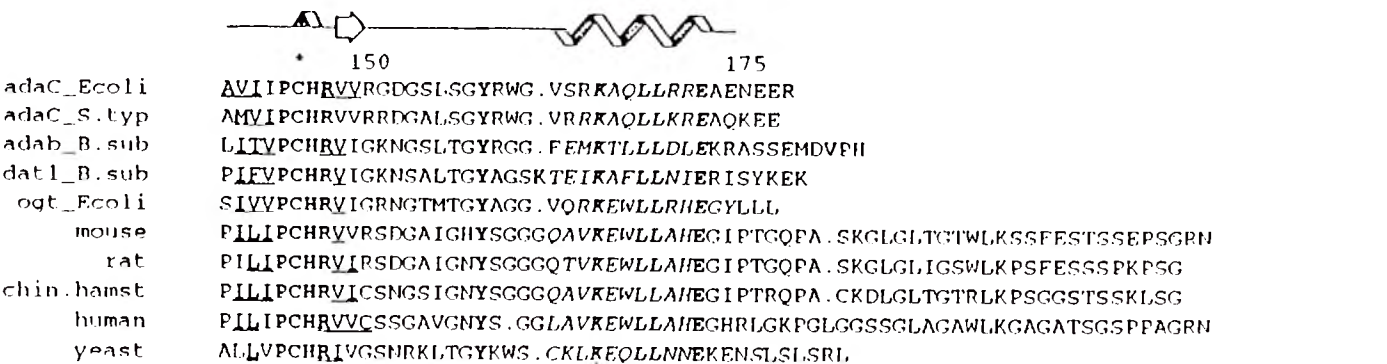
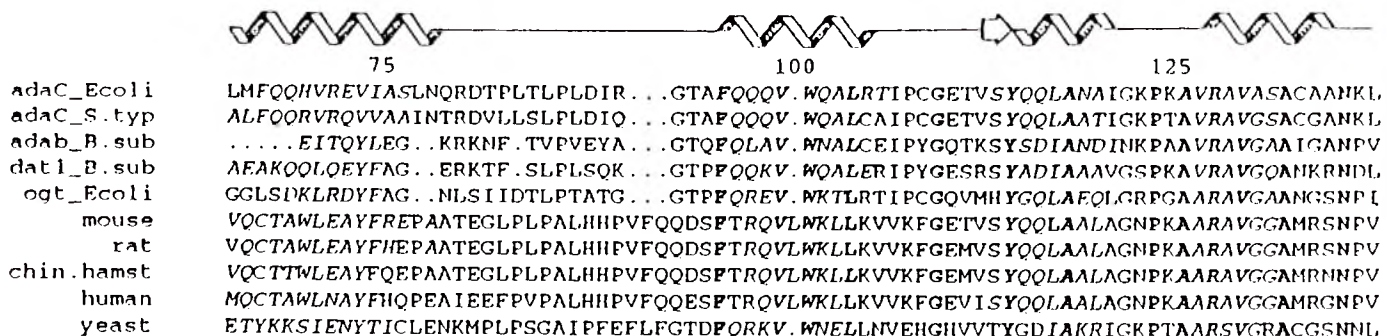
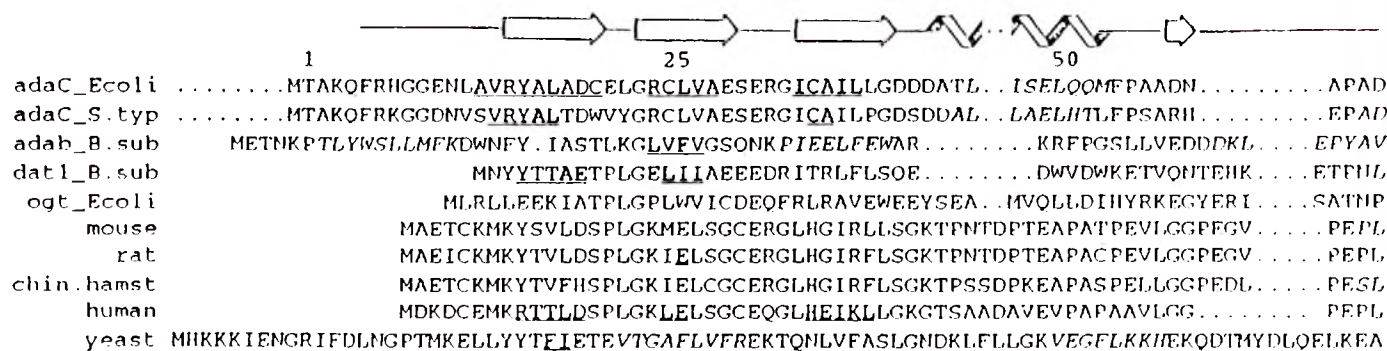


Ryc. 1 Schemat reperacji DNA przez białko Ada *E. coli* i indukcji odpowiedzi adaptatywnej. Czarne prostokąty w proksymalnych częściach genów odpowiadają miejscom wiązania Ada.

białka, lecz w zagłębieniu przesłoniętym  $\alpha$ -heliksem obecnym na C-końcu białka. Przedstawiony przez autorów model reperacji O6mG zakłada zmianę konformacyjną MGMT, po niespecyficznym przyłączeniu się do DNA, umożliwiającą kontakt aktywnej cysteiny z O6mG. Ze względu na szybkość i brak intermediiów w reakcji przeniesienia metylu z DNA na białko nie udało się dotąd wykrystalizować kompleksu MGMT z DNA, ale badania dichroizmu kołowego i analiza fluorescencyjna oddziaływania ludzkiej MGMT z DNA potwierdzają zmianę konformacyjną MGMT indukowaną przez DNA [26, 27].

O6mG nie jest jedynym substratem dla Ada. Cys<sub>321</sub> jest także akceptorem grupy metylowej z DNA zawie-

rającego O<sup>4</sup>-metylotyminę (O4mT). Uszkodzenie to powstające w DNA traktowanym środkami alkilującymi dziesięciokrotnie rzadziej niż O6mG, jest źródłem błędów replikacyjnych i może powodować tranzycję T→C [28]. MgtI reperuje O4mT ze znacznie mniejszą wydajnością niż O6mG [29, 30]. Wydajność reperacji podstawnika alkilowego w pozycji O<sup>6</sup> zależy natomiast od długości łańcucha węglowego. O<sup>6</sup>-etyloguanina jest reperowana dziesięciokrotnie słabiej niż O6mG [31], podobnie reperowana jest chloroetylowa pochodna guaniny. Podstawniki o dłuższym łańcuchu węglowym nie są praktycznie reperowane przez białko Ada. Grupy alkilowe zarówno O6mG jak i O4mT wystają do dużego rowka spirali DNA jednakże inne



Ryc. 2 Porównanie sekwencji aminokwasowej C-terminalnej domeny Ada i szeregu MGMT pro- i eukariotycznych. Identyczne aminokwasy zaznaczono tłustym drukiem. Nad sekwencją podano ustalone na podstawie analizy struktury krystalicznej elementy struktury drugorzędowej AdaC obejmującej końcowe 180 aminokwasów Ada. *E. coli* (strzałki odpowiadają struktutom β, wężyki odpowiadają struktutom α-heliakalnym). W obrębie sekwencji pozostałych MGMT zaznaczono przewidywane elementy struktury drugorzędowej (podkreślenia — struktury-β, kursywa α-heliks). Wg. Moore i wsp. [25] za zgodą autorów.

analogi zasad, w których podstawnik alkilowy znajduje się w dużym rowku nie są reperowane co wskazuje na istotną rolę tlenu w specyficzności działania MGMT. Istotnym czynnikiem jest także struktura kwasu nukleinowego. MGMT zdecydowanie preferuje dwuniciowy DNA nad jednoniciowym, a wydajność reperacji oligomerów rośnie wraz z ich długością. Dla porównania sama O6mG jest 10<sup>7</sup> razy gorszym substratem dla MGMT niż O6mG w dwuniciowym DNA [32].

Ada posiada także aktywność alkilotransferazy reperującej fosfortriestry powstające w wyniku alkilacji fosfocukrowego szkieletu DNA. Metylofosfortriestry (mPTs) występują w DNA w dwóch izomerycznych formach R i S. Białko Ada rozpoznaje jako substrat tylko stereoisomery S, tak więc reperowana jest mniej więcej połowa wiązań metylofosfortriestrowych w DNA [33]. Nie ma żadnych wyników wskazujących

na toksyczne działanie tych uszkodzeń, choć teoretycznie metylacja wiązania fosfodwustrowego zwiększa jego podatność na hydrolizę i tworzenie pęknięć jednoniciowych. Akceptorem grupy metylowej w reperacji mPTs jest cysteina w pozycji 69 białka znajdującego się w N-terminalnej części Ada [34]. Sekwencja PheArgProCysLysArgCys zawierająca aktywną cysteinę tylko w części przypomina miejsce aktywne dla O6mG, jest natomiast konserwowana w mPTs-metylotransferazach znalezionych u innych mikroorganizmów [35]. 20kDa N-terminalna domena Ada jest metaloproteidem zawierającym ściśle związany atom cynku. Badania magnetycznego rezonansu jądrowego <sup>113</sup>Cd i mutagenyzy sterowanej wykazały, że jon cynkowy związany jest przez unikalny motyw Cys-X3-Cys-X26-Cys-X2-Cys, w którym Cys69 stanowi jeden z czterech ligandów cysteinowych. Wyniki sugere-

rują, że jon cynkowy zaangażowany jest nie tylko w stabilizację struktury białka lecz także w bezpośrednią aktywację cysteiny przyjmującej grupę metylową z mPTs [36-38]. Stechiometryczne przeniesienie grupy metalowej z mPTs na Cys69 Ada powoduje zmianę konformacyjną białka umożliwiającą mu specyficzne wiązanie się do DNA. Zmetylowana Ada wiąże się do specyficznych sekwencji zwanych Ada-box znajdujących się w obszarze promotora genu *ada*, oraz kilku innych genów biorących udział w odpowiedzi adaptatywnej na środki alkilujące. Przyłączenie zmetylowanego białka Ada do Ada-box ułatwia przyłączenie polimerazy RNA i stymuluje transkrypcję. Tak więc oprócz bezpośredniej reperacji premutagennych uszkodzeń DNA, Ada działa jako chemosensor uszkodzeń metylacyjnych w komórce [39].

Pełna indukcja odpowiedzi adaptatywnej następuje w wyniku utrzymującego się w czasie działania środków metylujących. W stanie podstawowym w komórce *E. coli* znajduje się zaledwie kilka cząsteczek białka Ada. Tak więc zwiększenie poziomu transkrypcji następuje stopniowo wraz z kumulacją cząsteczek Ada metylowanych w reakcji z MPTs. Pełna indukcja wymaga ponad godziny, w tym czasie ilość Mgtl wzrasta z kilku do kilku tysięcy (3-4 tys.) cząsteczek na komórkę [40].

Oprócz Mgtl w zaadaptowanych komórkach kumulują się produkty trzech innych genów. *alkB* to gen leżący w operonie z genem *ada* (Ryc. 1) [40, 41]. Indukcja *alkaB* powoduje wzrost odporności komórki na działanie alkilatorów wchodzących z DNA w reakcje dwucząsteczkowe (SN2) jak np. metanosulfonian metylowy (MMS) czy dwumetylosiarczan (DMS). Dokładna funkcja 27kDa białka AlkB nie jest znana. Wprowadzenie genu *alkB* do komórek drożdży zwiększa ich odporność na działanie MMS co sugeruje, że AlkB nie wymaga innych białek bakteryjnych do działania [42]. Wydaje się także, że bierze udział w reperacji DNA a nie działa na drodze metabolicznej detoksykacji środków alkilujących, gdyż efekt jego nadprodukcji jest obserwowany nie tylko gdy komórka traktowana jest MMS, ale także gdy do nietraktowanej komórki wprowadzone jest DNA alkilowane *in vitro* [43].

Kolejnym genem *E. coli*, którego indukcja powoduje zwiększenie odporności na toksyczne działanie związków alkilujących jest *alkA*. Gen ten koduje glikozylazę 3metyloadeniny II. Jest to glikozylaza o szerokiej specyficzności, która oprócz 3mA (głównego toksycznego uszkodzenia alkilacyjnego w DNA) wycina z DNA także 3mG, 7mG i O<sup>2</sup>-pirymidyny [39]. Wykazano także, że substratem tego enzymu mogą być modyfikowane zasady o budowie znacznie odbiegającej od pochodnych alkilowych jak etenowe pochodne zasad powstające w DNA pod wpływem środowiskowego mutagenu chlorku winylu [44]. Geny *ada* i *alkA* nie są indukowane identycznie [45]. Wiąże się to między innymi z różnym położeniem Ada-box w stosunku do

regionów-35 w obrębie promotorów obydwu genów.

Czwarty gen indukowany w odpowiedzi adaptatywnej, *aidB*, koduje dehydrogenazę izowalerylo-koenzymu A [46]. Transkrypcja tego genu indukowana nie jest tylko przez środki alkilujące ale także, niezależnie od Ada, przez warunki beztlenowe [46] lub zakwaszenie środowiska [47]. Ostatnio wykazano obecność sekwencji wiążącej aktywną formę Ada w obrębie promotora *aidB* [48]. Sekwencja ta różni się od sekwencji ustalonych dla promotorów *alkA* i *ada* a jest zbliżona do regulatorowych sekwencji występujących w promotorach odpowiedników *ada* u innych bakterii. Ada indukuje transkrypcję *aidB* słabiej niż *ada*. Indukcja *aidB* wiąże się z odpornością komórki na działanie silnego mutagenu i kancerogenu MNNG. Mutagen ten nie działa bezpośrednio i wymaga aktywacji metabolicznej z udziałem tiolowych grup glutationu. Rola dehydrogenazy izowalerylo-koenzymu A w ochronie komórki przed działaniem MNNG nie jest jeszcze znana. Wydaje się, że enzym ten bierze udział w metabolicznej detoksykacji MNNG.

Niezależnie od indukcji szeregu enzymów zwiększających oporność komórki na działanie czynników alkilujących sama Ada bezpośrednio obniża nie tylko mutagenne ale i toksyczne działanie szeregu alkilatorów. Efekt ten odnosi się nie tylko do komórek *E. coli*, wprowadzenie genu *ada* do komórek roślinnych [49] czy ssaczy [50] powoduje zwiększenie oporności na działanie MNNG czy MNU. Stwierdzono także że myszy transgeniczne niosące gen *ada* są bardziej odporne na działanie mutagenne i kancerogenne MNNG [51,52]. Wyniki te potwierdzają z jednej strony rolę O6mG w mutagenym, toksycznym i kancerogenym działaniu środków alkilujących, z drugiej strony wskazują na uniwersalny charakter tej drogi reperacji DNA.

## II-2. Inne MGMT pro- i eukariontyczne

Jak wspomniano poprzednio oprócz Ada *Escherichia coli* posiada drugą MGMT kodowaną przez gen *ogt* [53]. Ogt (Mgt2) jest białkiem mniejszym od Ada, jego masa wynosi 19 kDa i zarówno wielkością jak i strukturą drugorzędową przewidywaną na podstawie sekwencji aminokwasowej odpowiada C-terminalnej domenie białka Ada. Zgodnie z tym Ogt zawiera tylko jedną aktywną cysteinę (Cys<sub>139</sub>) [54] i nie ma zdolności do reperacji wiązań metylofosfotrójestrowych. Cys139 jest akceptorem grup alkilowych zarówno z O<sup>6</sup>-guaniny jak i O<sup>4</sup>-tyminy, jednak specyficzność działania Ogt jest różna niż Ada. O ile O6mG jest reperowana przez obie metylotransferazy z podobną wydajnością to badania *in vitro* wykazały, że reperacja O4mT czy O6-etyloguaniny jest odpowiednio 80 i 173 razy wydajniejsza dla Mgt2 niż Ada [55]. Zgodnie z tym obserwuje się nadwrażliwość na mutagenne działanie środków etylujących a także propylujących *in vivo* w mutantach *ogt* [56]. Wskazuje to na rolę

Mgt2 w ochronie przed mutagenizacją indukowaną przez środki alkilujące o dłuższym łańcuchu alkilowym. Transkrypcja genu *ogt* nie jest indukowana i w komórce *E. coli* znajduje się stale około 30 cząsteczek tego białka. Wobec tylko kilku cząsteczek Ada na komórkę wydaje się, że to właśnie Ogt a nie Ada jest odpowiedzialne za reperację uszkodzeń alkilacyjnych w stanie podstawowym komórki przy pierwszym kontakcie z mutagenem. Podwójne mutanty *ada ogt* są nie tylko silnie nadwrażliwe na działanie środków alkilujących ale także wykazują podniesiony poziom mutacji spontanicznych, co potwierdza znaczenie MGMT w ochronie komórek przed działaniem endogennych czynników alkilujących [57].

Obecność jednej lub kilku MGMT wykazujących wysoką homologię do Ada lub Ogt wykryto w całym szeregu różnych rodzajów bakterii [przegląd 35]. Większość z nich jest indukowana przez uszkodzenia alkilacyjne. U *B. subtilis* wykazano, że podobnie jak u *E. coli*, aktywatorem transkrypcji jest zmetylowana forma MGMT powstająca w wyniku reperacji mPTs [35]. Aktywność mPTs-metylotransferazy może występować, podobnie jak dla Ada *E. coli*, w jednej cząsteczce białka wraz z metylotransferazą O6mG, ale także aktywności te mogą być związane z niezależnymi białkami. Tak jest w komórkach *B. subtilis* gdzie AdaA ma tylko zdolność reperacji mPTS, a AdaB i Dat reperują O6mG [58, 59]. U *M. luteus* wykryto trzy MGMT o różnej specyficzności: TI reperuje O6mG, TII-O4mT, a TIII-mPTs [60, 61].

Jedynym znanym dotychczas organizmem eukariotycznym posiadającym aktywność mPTs- metylotransferazy jest *A. nidulans* [35]. Podobnie jak u bakterii w komórkach *A. nidulans* znajduje się kilka MGMT o różnej specyficzności. Trzy z czterech MGMT *A. nidulans* są indukowalne [62, 35].

Drożdże (*S. cerevisiae*) posiadają tylko jedną MGMT kodowaną przez znajdujący się na chromosomie czwartym gen *MGT1* [63]. Głównym substratem dla MGT1 jest O6mG. Stwierdzono, że białko to może także reperować O4mT choć z wydajnością znacznie mniejszą niż O6mG [30]. Mutanty *MGT1* wykazują nadwrażliwość na mutagenne i toksyczne działanie środków alkilujących, mają też podwyższony poziom mutacji spontanicznych [63]. W eksponencyjnie rosnących hodowlach drożdży znajduje się około 150 cząsteczek MGMT na komórkę, dramatyczne obniżenie aktywności MGMT obserwuje się w hodowlach stacjonarnych [64]. Ekspresja genu *MGT1* nie jest specyficznie indukowana przez środki alkilujące [65]. W odróżnieniu od szeregu genów drożdżowych związanych z metabolizmem i reperacją DNA, w tym genu *MAG* kodującego glikozylazę 3metylo-adeniny, *MGT1* nie jest też indukowany przez inne uszkodzenia DNA [63]. Analiza regionów promotorowych wykazała jednakże wspólne elementy regulatorowe dla *MGT1* i *MAG* [66], których delekcja zmienia poziom transkrypcji tych genów [63]. Sekwencja represorowa

(URS), homologiczna do sekwencji konsensusowej, zaproponowana przez Sebastian i wsp. [67] obecna w promotorze *MGT1* znajduje się także w promotorze *MAG* oraz w promotorach dziesięciu innych genów związanych z metabolizmem i reperacją DNA. Ostatnio wykazano, że do tej sekwencji regulatorowej może przyłączać się białko Rpa — wielofunkcyjne białko biorące udział w inicjacji i elongacji replikacji DNA, w reperacji DNA przez wycinanie nukleotydów i w homologicznej rekombinacji [68].

W ostatnich latach poznano sekwencje szeregu MGMT ssaczy w tym chomika, szczura i myszy [69-71]. Został też sklonowany [72] i zlokalizowany na końcu długiego ramienia chromosomu 10 gen kodujący MGMT człowieka [73, 74]. Gen ten obejmuje 170 kb zawierających 5 eksonów [72]. Wszystkie poznane MGMT ssaków działają według tego samego „samobójczego” mechanizmu reperacji DNA i wykazują dużą homologię sekwencji aminokwasowej do Ogt i C-terminalnej części Ada (Ryc. 2). Znajdująca się w sekwencji PCHRV cysteina 145 reaguje z O6mG [75] i z bardzo niską wydajnością z O4mT [75,76]. Reperowana jest także O<sup>6</sup>-etyloguanina [78] i pochodne chloroetylowe O<sup>6</sup>-guaniny [79, 80]. Ta ostatnia aktywność ma istotne znaczenie w chemoterapii z użyciem haloetylowych pochodnych nitrozomocznika, gdyż obecność MGMT w komórce jest jednym z głównych czynników oporności na związki tego typu [81, 82].

Komórkowa zawartość MGMT u ssaków jest różna nie tylko dla różnych gatunków, ale zależy także od organu i rodzaju tkanki [78, 83-86]. Na przykład aktywność MGMT w hepatocytach szczurów jest znacznie wyższa niż w nieparenchymalnych komórkach wątroby [85]. Istnieją także ogromne różnice dla poszczególnych rodzajów komórek płuc [86]. Tkanki zawierające mniejszą ilość MGMT, np. mózg, są bardziej podatne na powstawanie raka pod wpływem środków alkilujących [75, 87].

Metylotransferazy ssacze nie podlegają indukcji adaptatywnej, takiej jak opisana u *E. coli*, jednakże wczesne doświadczenia *in vivo* wykazały dwu-trzykrotny wzrost aktywności MGMT w wątrobie szczurów chronicznie karmionych dwumetylo-*N*-nitrozoaminą [88]. Stwierdzono następnie, że indukcja MGMT może być spowodowana szeregiem niespecyficznych czynników jak promieniowanie jonizujące, hepatotoksyny czy hormony [89, 90]. Doświadczenia *in vitro* z szeregiem różnych hodowli tkankowych nie potwierdziły indukcji MGMT jako zjawiska występującego powszechnie [90, 91], tym nie mniej w kilku liniach hepatomy szczurów i człowieka obserwuje się indukcję MGMT pod wpływem środków alkilujących i promieniowania ultrafioletowego [93-96], a w mysich komórkach C3H10Ti/2 pod wpływem promieniowania jonizującego lub bleomycyny [95, 97]. Mechanizm tej indukcji nie jest znany, stwierdzono tylko, że zwiększeniu aktywności MGMT towarzyszy zwiększony

poziom mRNA MGMT. Wskazuje to na regulację na poziomie transkrypcji [98, 99].

W dużej mierze niewyjaśnione jest też zjawisko epigenetycznego wyłączenia MGMT w około 60% komórek transformowanych wirusem SV40 lub Epstein-Bara i w 20% innych linii ludzkich komórek rakowych. Komórki takie określane jako Mer<sup>-</sup> albo Mex<sup>-</sup> są wyjątkowo wrażliwe na mutagenne i toksyczne działanie środków alkilujących [98]. Większość linii Mer<sup>-</sup> (Mex<sup>-</sup>) posiada nienaruszony gen kodujący MGMT a brak aktywności związany jest z wyłączeniem transkrypcji tego genu [101, 102]. Badania metylacji cytozyn w sekwencjach CpG wykazały, że metylowane cytozyny w obrębie promotora [103-105], a także wewnątrz kodującej sekwencji genu, mają wpływ na poziom transkrypcji genu MGMT [106-108]. To czy dana metylacja CpG powoduje wyciszenie czy aktywację transkrypcji zależy od jej położenia w obrębie genu [105]. Obniżenie ekspresji MGMT w komórkach Mex<sup>-</sup> jest powiązane z wyłączeniem kilku innych genów [109]. Znaczenie tej wspólnej regulacji nie jest znane.

### III. Alternatywne systemy reperacji O6mG-DNA

Oprócz MGMT O<sup>6</sup>-alkiloguanina może być rozpoznawana i usuwana z DNA w wyniku naprawy przez wycinanie nukleotydów (NER). Jest to pierwszy poznany i powszechnie występujący system naprawy DNA, w którym rozpoznaniu uszkodzenia towarzyszy endonukleolityczne nacięcie nici DNA po obu jego stronach. W ten sposób zostaje wycięty kilkunastonukleotydowy, jednoniciowy fragment DNA zawierający uszkodzenie a powstała luka zapełniana jest przez polimerazę DNA.

U *E. coli* kompleks rozpoznający i wycinający uszkodzone DNA tworzą produkty genów *uvrA*, *B* i *C* [110]. Działanie tego systemu tradycyjnie wiązano z dużymi uszkodzeniami DNA, zmieniającymi jego strukturę, takimi jak powstające pod wpływem promieniowania ultrafioletowego dimery tyminy lub duże addukty chemiczne. Zgodnie z tym wrażliwość mutantów *E. coli* w tej drodze reperacji DNA na działanie czynników alkilujących rośnie wraz ze wzrostem podstawnika alkilowego [111]. To, że kompleks UvrABC rozpoznaje guaninę modyfikowaną w pozycji O<sup>6</sup> zostało wykazane w doświadczeniach mutagenyzy sterowanej, w których badano reperację O6-butyloguaniny [8, 112]. Te same prace przyniosły pierwsze sugestie, że kompleks UvrABC może rozpoznawać małe modyfikacje w DNA takie jak O6mG [8, 112]. Reperacja O6mG w drodze wycinania nukleotydów (NER) została następnie potwierdzona *in vitro* [113]. Doświadczenia mutagenyzy *E. coli* z użyciem przeciwciał przeciwko O<sup>6</sup>-metylo- i O<sup>6</sup>-etyloguaninie wykazały, że w ciągu pierwszej godziny po działaniu czynników alkilujących (zanim odpowiedź adaptatywna

jest w pełni wyindukowana) dominującą rolę w usuwaniu badanych uszkodzeń z DNA odgrywa endonukleaza UvrABC [114].

System reperacji przez wycinanie nukleotydów preferencyjnie usuwa uszkodzenia z transkrybowanej nici DNA [115], z tym zjawiskiem można wiązać obserwowaną przez niektórych autorów zależność częstości tranzycji GC→AT indukowanych przez MNNG od poziomu transkrypcji mutowanego genu [116].

Kolejnym systemem reperacyjnym związanym z reperacją O6mG jest postreplikacyjny system korekcji błędnie sparowanych zasad (mismatch repair). Zarówno w organizmach pro- jak i eukariontycznych system ten odpowiedzialny jest za usuwanie błędów replikacyjnych a także korygowanie heterodupleksów powstających pomiędzy homologicznymi fragmentami DNA w czasie rekombinacji [117]. Białkiem rozpoznającym niepasujące zasady w DNA *E. coli* jest MutS. Białko to mające swoje homologi u drożdży i w komórkach ludzkich [118, 119], wiąże się z miejscem w DNA rozpoznawanym jako błąd co powoduje tworzenie kompleksu białek MutS, MutL i MutH. Kompleks ten umożliwia białku MutH nacięcie nowosyntetyzowanej nici DNA w najbliższej sekwencji GATC. Nacięcie nici jest sygnałem do jej degradacji aż do miejsca uszkodzenia i dosyntetyzowania nowej nici przez polimerazę III [117]. W tej drodze reperacji występują wyjątkowo długie, do 1 kb, odcinki degradacji i resyntezy DNA toteż zbyt duża liczba uszkodzeń rozpoznawanych przez ten system lub dodatkowe pęknięcia DNA mogą powodować efekt toksyczny.

Szereg wyników dotyczących wrażliwości i mutagenyzy indukowanej przez środki alkilujące, w szczepach *E. coli* niosących uszkodzone białka zaangażowane w reperację błędnie sparowanych zasad, sugerują, że system ten rozpoznaje pary naturalnych zasad z O6mG jako błąd [120, 121] podobnie jak to ma miejsce dla innych analogów zasad.

Ostatnie lata przyniosły wyniki wskazujące na związek reperacji błędnie sparowanych zasad z występującym wśród linii komórek ssaczych zjawiskiem tolerancji na działanie środków metylujących. Zjawisko to definiuje się jako oporność na toksyczne działanie O6mG w DNA, któremu nie towarzyszy zwiększenie reperacji tego uszkodzenia. Po raz pierwszy zjawisko to stwierdzono izolując komórki odporne na MNNG spośród limfoblastoidalnych komórek TK6 [122], które mają charakter Mex<sup>-</sup> i wykazują bardzo silną wrażliwość na środki alkilujące. Oporne izolanty tak jak komórki rodzicielskie nie mają aktywności MGMT i są nadwrażliwe na mutagenne działanie MNNG, utraciły natomiast charakterystyczną dla komórek Mex<sup>-</sup> nadwrażliwość na toksyczne działanie tego mutagenu [122]. Stwierdzono także, że MNNG odporny wariant komórek wykazuje czterdziestokrotnie podwyższony poziom mutacji spontanicznych [122]. W opornych na MNNG izolantach komórek HeLaMR pokazano, że poziom modyfikacji DNA

powstających pod wpływem środków metylujących, w tym O6mG, jest taki sam jak w komórkach rodzicielskich [123].

Jeden z modeli tłumaczących zjawisko tolerancji na działanie środków metylujących [122] zakłada, że pary O6mG:C i O6mG:T są rozpoznawane jako błąd przez system reperacji błędnie sparowanych zasad co inicjuje proces reperacji przez wycinanie. Ponieważ reperacji podlega nowosyntetyzowana nić DNA to, gdy O6mG znajduje się na nici starej, trakty reperacyjne bieżą po przeciwnej nici niż O6mG i skazane są na niepowodzenie gdyż jakakolwiek zasada byłaby inkorporowana na przeciw O6mG powstająca para będzie rozpoznawana jako błąd. Prowadziłoby to do powstania miejsc permanentnej degradacji i resyntezy DNA. Powyższy model jest zbieżny z obserwacją Day i w s p. [124], że w komórkach Mex<sup>-</sup> traktowanych MNNG występuje zwiększony poziom reperacyjnej syntezy DNA i utrzymują się pęknięcia jednoniciowe. Uszkodzenie systemu reperacji błędnie sparowanych zasad chroniłoby komórki Mex<sup>-</sup> przed tym efektem.

Zgodnie z powyższą hipotezą szereg linii wykazujących tolerancję na działanie środków metylujących ma fenotyp charakterystyczny dla uszkodzenia drogi reperacji błędnie sparowanych zasad tj. podniesiony poziom mutagenyzy spontanicznej i niestabilność sekwencji mikrosatelitarnych. Dla części tych linii wykazano wręcz brak aktywności białka wiążącego się do błędnie sparowanych zasad lub reperacji takich błędów *in vitro* [125-128]. Komplementacja defektu tej drogi reperacji poprzez wprowadzenie ludzkiego chromosomu 3 niosącego gen *hMLH1* (odpowiednik bakteryjnego *mutl*) powoduje nie tylko stabilizację sekwencji mikrosatelitarnych ale także zwiększa wrażliwość na działanie MNU [129].

Powyższe wyniki silnie sugerują, że uszkodzenie systemu błędnie sparowanych zasad jest przyczyną komórkowej tolerancji na działanie środków metylujących, jednakże molekularne podstawy tego zjawiska nie są jeszcze do końca poznane i nie można wykluczyć udziału innych mechanizmów w tym procesie [130, 131]. Niewątpliwie natomiast kumulacja O6mG w DNA może stanowić naturalną presję selekcyjną dającą przewagę komórkom mającym wyłączony system reperacji błędnie sparowanych zasad co z kolei jak pokazują badania ostatnich lat, może być związane z inicjalnymi stadiami znacznej części raków okrężnicy i innych narządów ludzkich [132].

#### IV. Podsumowanie

O6mG powstaje w DNA pod wpływem zarówno wewnątrzkomórkowych jak i środowiskowych czynników alkilacyjnych. Od reperacji tego uszkodzenia w zasadniczy sposób zależy ochrona komórki przed toksycznym, mutagenym i kancerogennym działaniem tych czynników.

Metylotransferaza O<sup>6</sup>-metyloguaniny-DNA występująca we wszystkich dotychczas badanych organizmach jest głównym białkiem reperacyjnym odpowiedzialnym za usuwanie O6mG z DNA. W wyniku jednostopniowej, stechiometrycznej reakcji grupa metylowa z O6mG zostaje przeniesiona na aktywną cysteinę wewnątrz białka MGMT. Ponieważ reakcja ta jest nieodwracalna, a zawierająca metylcysteinę MGMT jest nieaktywna, to od ilości cząsteczek MGMT zależy komórkowy potencjał obronny przed mutagenym, toksycznym i kancerogennym działaniem O6mG.

Regulacja ekspresji genów kodujących MGMT jest dobrze poznana u bakterii gdzie sama MGMT może pełnić rolę sensora uszkodzeń alkilacyjnych i aktywatora transkrypcji genów w tzw. odpowiedzi adaptatywnej.

W większości badanych komórek ssaków poziom MGMT nie jest indukowalny choć różni się on dla różnych organów czy tkanek, możliwe są nawet różnice osobnicze dla danego rodzaju komórek. Kilukrotna indukcja aktywności MGMT może występować w hepatocytach. W odróżnieniu od odpowiedzi adaptatywnej u *E. coli* nie jest to indukcja specyficzna i może następować pod wpływem szeregu różnych czynników uszkadzających DNA, hepatotoksyn czy hormonów. Mechanizm tej regulacji nie jest znany. Podobnie dalszych badań wymaga poznanie molekularnego sygnału i mechanizmu prowadzącego do epigenetycznego wyłączenia aktywności MGMT w komórkach Mex<sup>-</sup>. Obecnie wiadomo tylko, że istotną rolę ekspresji genów kodujących MGMT odgrywa wzór metylacji CpG w obrębie zarówno sekwencji regulatorowych jak i kodujących tych genów.

Udział innych komórkowych systemów reperacji DNA w usuwaniu O6mG może mieć szczególne znaczenie w komórkach, w których aktywność MGMT jest obniżona w wyniku wysycenia w trakcie reperacji lub regulacyjnie wyłączona. U *E. coli* w takich warunkach istotną rolę reperacyjną odgrywa endonukleaza UvrABC. Nie wiadomo czy podobnie działa analogiczny system w komórkach ssaczy.

Szereg wyników wskazuje, że pary tworzone przez O6mG w DNA są rozpoznawane przez system reperacji błędnie sparowanych zasad zarówno w komórkach pro- jak i eukariotycznych. Szalenie interesujące, choć także wymagające dalszych wyjaśnień, są dane pokazujące, że działanie tego systemu reperacyjnego zwiększa wrażliwość komórek na toksyczny efekt O6mG w DNA. Wydaje się, że w wyniku działania tej drogi reperacyjnej sygnał obecności w DNA tego silnie mutagennego uszkodzenia jest amplifikowany prowadząc do zatrzymania cyklu komórkowego lub śmierci komórki.

Reasumując, ostatnie lata przyniosły wiele szczegółów dotyczących molekularnych podstaw regulacji i reperacji O6mG-DNA u *E. coli*. Potwierdzono także uniwersalność mechanizmów reperacyjnych w komór-

kach pro- i eukariontów. Jesteśmy natomiast dopiero u progu zrozumienia mechanizmów regulacyjnych związanych z przekazywaniem sygnału o uszkodzeniach DNA, ekspresją genów i modulacją aktywności systemów reperacyjnych w komórkach organizmów wyższych.

Artykuł otrzymano 4 września 1995 r.  
Zaakceptowano do druku 13 listopada 1995 r.

## Piśmiennictwo

1. Singer B, Grunberger D (1983) W: Molecular biology of mutagenesis and carcinogenesis, Plenum Press, NY: 55-78
2. Loveless A (1969) *Nature* (Lond) **233**: 206-207
3. Leonard GA, Thomson J, Watson WO, Brown T (1990) *Proc Natl Acad Sci USA* **87**: 9573-9576
4. Swann PF (1990) *Mutation Res* **233**: 81-94
5. Trochen D, Topal MD (1983) *Carcinogenesis* **4**: 1591-1597
6. Singer B, Dosanjh MK (1990) *Mutation Res* **233**: 45-51
7. Loechler EL, Green CL, Essigmann JM (1984) *Proc Natl Acad Sci USA* **81**: 6271-6277
8. Chambers RW, Śledziwska-Gójska E, Hirani-Hojatti S, Borowy-Borowski H (1985) *Proc Natl Acad Sci USA* **82**: 7173-7177
9. Bhanot OS, Ray A (1986) *Proc Natl Acad Sci USA* **83**: 7348-7352
10. Gordon AJE, Burns PA, Glickman BW (1990) *Mutat Res* **233**: 95-103
11. Śledziwska-Gójska, Grzesiuk E, Plachta A, Janion C (1992) *Mutagenesis* **7**: 41-46
12. Richardson KK, Richardson FC, Crosby RM, Swenberg JA, Scopek TR (1978) *Proc Natl Acad Sci USA* **84**: 344-348
13. van Zeeland AA (1988) *Mutagenesis* **3**: 179-191
14. Zarbl H, Sukumar S, Arthur AV, Martin-Zanca D, Barbacid M (1985) *Nature* (Lond) **315**: 382-385
15. Mitra G, Pauly GT, Kumar R, Pei GK, Hughes SH, Moschel RC, Barbacid M (1989) *Proc Natl Acad Sci USA* **86**: 8650-8654
16. Samson L, Cairns J (1977) *Nature* (Lond) **267**: 281-283
17. Chendel P, Robins P (1978) *Proc Natl Acad Sci USA* **75**: 6017-6020
18. Demple B (1990) W: Protein methylation, ed. Paik WK, Kim S CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla **2**: 285-304
19. Teo I, Sedgwick B, Demple B, Li B, Lindahl T (1984) *EMBO J* **3**: 2151-2157
20. Olsson M, Lindahl T (1980) *J Biol Chem* **255**: 10569-10571
21. Spratt TE, de los Santos H (1992) *J Biol Chem* **267**: 3200-3204
22. Demple B, Sedgwick B, Robins P, Totty N, Waterfield MD, Lindahl T (1985) *Proc Natl Acad Sci USA* **82**: 2688-2692
23. Takano K, Nakabeppu Y, Sekiguchi M (1988) *J Mol Biol* **201**: 261-271
24. Ihara K, Kawate H, Chueh L-L, Sekiguchi M (1994) *Mol Gen Genet* **243**: 379-389
25. Moore MH, Gulbis JM, Dodson EJ, Demple B, Moody PCE (1994) *EMBO J* **13**: 1495-1501
26. Takahashi M, Sakumi K, Sekiguchi M (1990) **29**: 3431-3436
27. Chan C-L, Wu Z, Ciardelli T, Eastman A, Brestnik E (1993) *Arch Biochem Biophys* **300**: 193-200
28. Dosanjh MK, Menichini P, Eritja R, Singer B (1993) *Carcinogenesis* **14**: 1915-1919
29. McCarthy TV, Karran P, Lindahl T (1984) *EMBO J* **3**: 545-550
30. Sassanfar M, Dosanjh M, Essigmann J, Samson L (1991) *J Biol Chem* **266**: 2767-2771
31. Sedgwick B, Lindahl T (1982) *J Mol Biol* **154**: 169-175
32. Demple B (1990) W: Protein methylation, ed. Paik WK, Kim S CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla **2**: 285-304
33. McCarty TV, Lindahl T (1985) *Nucleic Acids Res* **13**: 2683-2698
34. Sedgwick B, Robins P, Totty N, Lindahl T (1988) *J Biol Chem* **263**: 4430-4433
35. Samson L (1992) *Molec Microbiol* **6**: 825-831
36. Myers LC, Verdin GL, Wagner G (1993) *Biochemistry* **32**: 14089-14094
37. Myers LC, Terranova MP, Ferenz AF, Wagner G, Verdin GL (1993) *Science* **261**: 1164-1167
38. Myers LC, Jackof F, Verdin GL (1995) *J Biol Chem* **270**: 6604-6670
39. Lindahl T, Sedgwick B, Sekiguchi M, Nakabeppu Y (1988) *Ann Rev Biochem* **57**: 133-157
40. LeMotte PK, Walker GC (1985) *J Bacteriol* **161**: 888-895
41. Kondo H, Nakabeppu Y, Kataoka H, Kuhara S, Kawabata S, Sekiguchi M (1986) *J Biol Chem* **261**: 15772-15777
42. Chen BJ, Carroll P, Samson L (1994) *J Bacteriol* **176**: 6255-6261
43. Kataoka H, Yamamoto Y, Sekiguchi M (1983) *J Bacteriol* **153**: 1301-1307
44. Mroczkowska MM, Kolasa IK, Kuśmierk JT (1993) *Mutagenesis* **8**: 341-348
45. Saget BM, Shevell DE, Walker GC (1995) *J Bact* **177**: 1268-1295
46. Landini P, Hajec LI, Volkert MR (1994) *J Bacteriol* **176**: 6583-6589
47. Smirnova GV, Oktyabrsky ON, Moshonkina EV, Zakirova N (1994) *Mutation Res* **314**: 51-56
48. Landini P, Volkert MR (1995) *J Bacteriol* **270**: 8285-8289
49. Angelis K, Briza J, Satava J, Skakal I, Veleminsky J, Vasak J, Kleibl K, Margison GP (1992) *Mutation Res* **273**: 271-280
50. Waldstein EA (1990) *Carcinogenesis* **11**: 21-26
51. Nakatsuru Y, Matsukuma S, Nemoto N, Sugano H, Sekiguchi M, Ishikawa T (1993) *Proc Natl Acad Sci USA* **90**: 6468-6472
52. Rajewsky MF (1993) *Jpn J Cancer Res* **84**: 1-3
53. Potter PM, Wilkinson MC, Fitton J, Carr FJ, Brennan J, Cooper DP (1987) *Nucl Acids Res* **15**: 9177-9193
54. Harris LC, Potter PM, Margison GP (1992) *Biochem Biophys Res Commun* **187**: 425-431
55. Wilkinson MC, Potter PM, Cawkwell L, Georgiadis P, Patel D, Swann PF, Margison GP (1989) *Nucleic Acid Res* **17**: 8475-8484
56. Hera AN, Rafferty AE, Margison GP, Pueyo C (1994) *Mol Gen Genet* **242**: 744-748
57. Rebeck GW, Samson L (1991) *J Bacteriol* **173**: 2068-2076
58. Morohoshi F, Hayashi K, Munakate N (1990) *Nucl Acids Res* **18**: 5473-5480
59. Kodama K, Nakabeppu Y, Sekiguchi (1989) *Mutat Res* **218**: 153-163
60. Ather A, Ahmed Z, Riazuddin S (1984) *Nucl Acids Res* **12**: 2111-2126
61. Riazuddin S, Arther A, Sohi A (1987) *Nucl Acids Res* **15**: 9471-9485
62. Baker SM, Margison GP, Strike P (1992) *Nucl Acids Res* **20**: 645-651
63. Xiao W, Samson L (1993) *Proc Natl Acad Sci USA* **90**: 2117-2121
64. Goth-Goldstein R, Johnson PL (1990) *Mol Gen Genet* **221**: 353-357
65. Sassanfar M, Samson L (1990) *J Biol Chem* **265**: 20-25
66. Xiao W, Singh KK, Chen B, Samson L (1993) *Nucl Acids Res* **20**: 7213-7221
67. Sebastian J, Kranz B, Sancar GB (1990) *Mol Cell Biol* **10**: 4630-4637
68. Singh KK, Samson L (1995) *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 4907-4911
69. Rafferty JA, Eilder RH, Watson AJ, Cawkwell L, Potter PM, Margison GP (1992) *Nucl Acids Res* **20**: 1891-1895
70. Sakumi K, Shiraishi A, Hayakawa H, Sekiguchi M (1992) *Nucl Acids Res* **19**: 5597-5601
71. Shiota S, von Wronski MA, Tano K, Bigner DD, Brent TP, Mitra S (1992) *Biochemistry* **31**: 1897-1903

72. Nakatsu Y, Kazue H, Hayakawa H, Shimizu K, Sekiguchi M (1993) *Mutation Res* **293**: 118-132
73. Rydberg B, Spurr N, Karran P (1990) *J Biol Chem* **265**: 9563-9569
74. Natarajan AT, Vermenlen S, Darroudi F, Valentine MB, Brent TP, Mitra S, Tano K (1992) *Mutagenesis* **7**: 983-85
75. Brent TP, Dolan ME, Frankel-Conrat M, Hall J, Karran P, Laval F, Margison GP, Montesano R, Pegg AE, Potter PM (1988) *Proc Natl Acad Sci USA* **85**: 1745-1762
76. Koike G, Maki H, Takeya H, Hayakawa H, Sekiguchi M (1990) *J Biol Chem* **265**: 14754-14762
77. O'Toole SM, Pegg AE, Swenberg JA (1993) *Cancer Res* **53**: 3895-4008
78. Pegg AE, Dolan ME (1987) *Pharmacol Theor* **34**: 167-170
79. Ling-Ling C, Nakamura T, Nakatsu Y, Sakumi K, Hanakawa H, Sekiguchi M (1992) *Carcinogenesis* **14**: 837-843
80. Pegg EA, Wiest L, Foor RS, Mitra S, Pary W (1983) *J Biol Chem* **258**: 2327-2333
81. Bodell WJ, Takuda K, Ludlum DB (1988) *Cancer Res* **48**: 4489-4495
82. Brent TP, Haughton PJ, Haughton JA (1985) *Proc Natl Acad Sci USA* **82**: 2985-2989
83. Yarosh DB (1985) *Mutation Res* **145**: 1-16
84. Gerson SL, Trey JE, Miller K, Berger NA (1986) *Carcinogenesis* **7**: 745-749
85. Swenberg JA, Badell MA, Billings KC, Umbenhauer DR, Pegg AE (1982) *Proc Natl Acad Sci USA* **79**: 5499-5502
86. Belinsky SA, Dolan ME, White CW, Maronpot RR, Pegg AE, Anderson ME (1988) *Carcinogenesis* **9**: 2053-2058
87. Goth R, Rajewsky MF (1974) *Proc Natl Acad Sci USA* **71**: 639-643
88. Montesano R, Bresil H, Margison GP (1979) *Cancer Res* **39**: 1789-1793
89. Pegg EA (1990) *Cancer Res* **50**: 6119-6129
90. Schmerald I, Wiester OD (1986) *Cancer Res* **46**: 245-249
91. Foote RS, Mitra S (1984) *Carcinogenesis* **5**: 277-282
92. Wani G, Wani AA, D'Ambrosio G, Samuel M, Lewder E, D'Ambrosio S (1989) *Teratogen Carcinogen Mutagen* **9**: 259-270
93. Morten JEN, Margison GP (1988) *Carcinogenesis* **9**: 45-50
94. Frosina G, Laval F (1987) *Carcinogenesis* **8**: 91-95
95. Laval F (1990) *Mutation Res* **233**: 211-218
96. Grombacher T, Kaina B (1995) *Biochem Biophys Acta* **1270**: 63-72
97. von Hofe E, Kennedy AR (1988) *Carcinogenesis* **9**: 679-685
98. Fritz G, Tano K, Mitra S, Kaina B (1991) *Mol Cell Biol* **11**: 4660-4667
99. Laval F (1991) *BBRC* **176**: 1086-1091
100. Day III RS, Ziolkowski CHJ, Scudiero DA, Meyer SA, Lubieniecki AS, Girardi AJ, Galloway SM, Bynum GD (1980) *Nature (lond)* **288**: 724-727
101. Ostrowski MA, von Wronski MA, Bigner SH, Rasheed A, Schold JfSC, Brent TP, Mitra S, Bigner DD (1991) *Carcinogenesis* **12**: 1737-1744
102. Harris K, Potter PM, Remack JS, Brent TP (1992) *Cancer Res* **52**: 6404-6406
103. Harris LC, Remack JS, Brent TP (1994) *Biochem Biophys Acta Gene Structure Expression* **1217**: 141-146
104. von Wronski MA, Brent TP (1994) *Carcinogenesis* **15**: 577-582
105. Qian X, von Wronski MA, Brent TP (1995) *Carcinogenesis* **16**: 1385-1390
106. Pieper RO, Castello JF, Kroes RA, Futscher BW, Marathi U, Erricson LC (1991) *Cancer Comm* **3**: 241-253
107. Wang Y, Kato T, Ayaki H, Ishizaki K, Tano K, Mitra S, Ikanage M (1992) *Mutation Res* **273**: 221-230
108. Cairn-Smith S, Karran P (1992) *Cancer Res* **52**: 5257-5263
109. Karran P, Stephenson C, Cairn-Smith S, Macpherson P (1990) *Mutation Res* **233**: 23-30
110. Lin J-J, Sancar A (1992) *Molec Microbiol* **6**: 2219-2224
111. Tod ML, Schendel PF (1983) *J Bacteriol* **156**: 6-12
112. Chamber BW, Sledziewska-Gójska E, Hirani-Hojatti S (1988) *Molec Gen Genet* **213**: 325-331
113. Voigt JM, Van Houten B, Sancar A, Topal MD (1989) *J Biol Chem* **264**: 5172-5176
114. Samson L, Thomala J, Rajewsky MF (1988) *EMBO J* **7**: 261-267
115. Selby CP, Sancar A (1994) *Microbiol Rev* **58**: 317-329
116. Ito T, Nakamura T, Maki H, Sekiguchi M (1994) *Mutation Res* **314**: 273-285
117. Modrich P (1991) *Ann Rev Genet* **25**: 229-253
118. Prolla TA, Pang Q, Alani E, Kolodner RD, Liskay RH (1994) *Science* **265**: 19091-1093
119. Leach FS, Nikolaidis NC, Papadopoulos N, et al (1993) **75**: 1215-1225
120. Karran P, Marinus MG (1982) *Nature (lond)* **286**: 868-869
121. Sledziewska-Gójska E (1993) *Mutation Res* **294**: 1-8
122. Goldmacher VS, Cuzick RA, Thilly WG (1986) *J Biol Chem* **261**: 12462-12471
123. Goth-Goldstein R (1987) *Carcinogenesis* **8**: 1449-1453
124. Day RS, Babich MA, Yarosh DB, Scudiero DA (1987) *J Cell Sci Sci Suppl* **6**: 333-353
125. Aquilina G, Hess D, Branch P, McGeoch C, Casciano I, Karran P, Bignami M (1994) *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 8905-8909
126. Branch P, Aquilina G, Bignami M, Karran P (1993) *Nature (lond)* **362**: 652-654
127. Umar A, Boyer JC, Thomas DC, Nguyen DG, Resinger JI, Boyd J, Ionov Y, Perocho M, Kunkel TA (1994) *J Biol Chem* **269**: 14367-14370
128. Kat A, Thilly WG, Fang WH, Longley MJ, Li GM, Modrich P (1993) *Proc Natl Acad Sci USA* **90**: 6424-6428
129. Koi M, Umar A, Chauhan DP, Cherian SP, Carothers JM, Kunkel TA (1994) *Cancer Res* **54**: 4308-4312
130. Fortini P, Bignami M, Dogliotti E (1990) *Mutation Res* **236**: 129-137
131. Fortini P, Rosa S, Zijo A, Cacagnille A, Bignami M, Dogliotti E (1992) *Carcinogenesis* **13**: 87-93
132. Branch P, Hampson R, Karran P (1995) *Cancer Res* **55**: 2304-2309

**W. Mejbaum-Katzenellenbogen's Seminars 3.**  
**Liposomes in Biology and Medicine**  
*Wrocław, Poland, June 3-5 1996*  
 Info: Prof. Arkadiusz Kozubek  
 University of Wrocław, Inst. Biochemistry,  
 Department of Genetic Biochemistry,  
 ul. Przybyszewskiego 63/77,  
 PL-51-148 Wrocław, Poland  
 Fax (48) +71 252-930



# Naprawa oksydacyjnych uszkodzeń DNA u *Prokaryota*

## Prokaryotical mechanisms of DNA oxidative damage repair

TOMASZ H. ZASTAWNY\*

### Spis treści:

- I. Wstęp
- II. DNA-Glikozylazy
  - II-1. Białko FPG
  - II-2. Glikozylaza uracylowa (UDG)
  - II-3. Glikozylaza hipoksantynowa
- III. Nukleazy uczestniczące w usuwaniu oksydowanych pochodnych zasad
  - III-1. Endonukleaza III — białko NTH
  - III-2. Egzonukleaza III
  - III-3. Endonukleaza IV
  - III-4. Endonukleaza VIII
  - III-5. Endonukleaza V z bakteriofaga T4
  - III-6. Kompleks enzymatyczny uvrABC
- IV. Uwagi końcowe

### Contents:

- I. Introduction
- II. DNA-Glycosylases
  - II-1. FPG protein
  - II-2. Uracil-glycosylase (UDG)
  - II-3. Hypoxanthic-glycosylase
- III. Nucleotide-excision repair of oxidative base damage
  - III-1. Endonuclease III — NTH protein
  - III-2. Exonuclease III
  - III-3. Endonuclease IV
  - III-4. Endonuclease VIII
  - III-5. T4 Endonuclease V
  - III-6. ABC Excinuclease
- IV. Concluding remarks

**Wykaz stosowanych skrótów:** UNG — Glikozylaza uracylowa; FPG — N-glikozylaza formamidopirymidynowa; 5OHdC — 5-hydroksy-2'-deoksyucytydina; 5OHdU — 5-hydroksy-2'-deoksyuurydina; MMS — metylosulfonian metanu (*methyl methane sulfonate*).

### I. Wstęp

Wyniki badań nad procesami nowotworzenia wykazują, że około 80-90% nowotworów ludzkich rozwija się w następstwie uszkodzeń DNA. Powstają one w wyniku zmian metabolizmu komórek oraz na skutek działania czynników zewnętrznych, takich jak promieniowanie jonizujące, promieniowanie ultrafioletowe oraz karcynogeny chemiczne [1]. Czynniki te oddziałują na DNA zarówno w sposób bezpośredni, powodując pęknięcia łańcucha oraz tworząc addukty bądź pośrednio indukując powstawanie wolnych rodników tlenowych odpowiedzialnych m.in. za powstawanie oksydacyjnych pochodnych zasad azotowych.

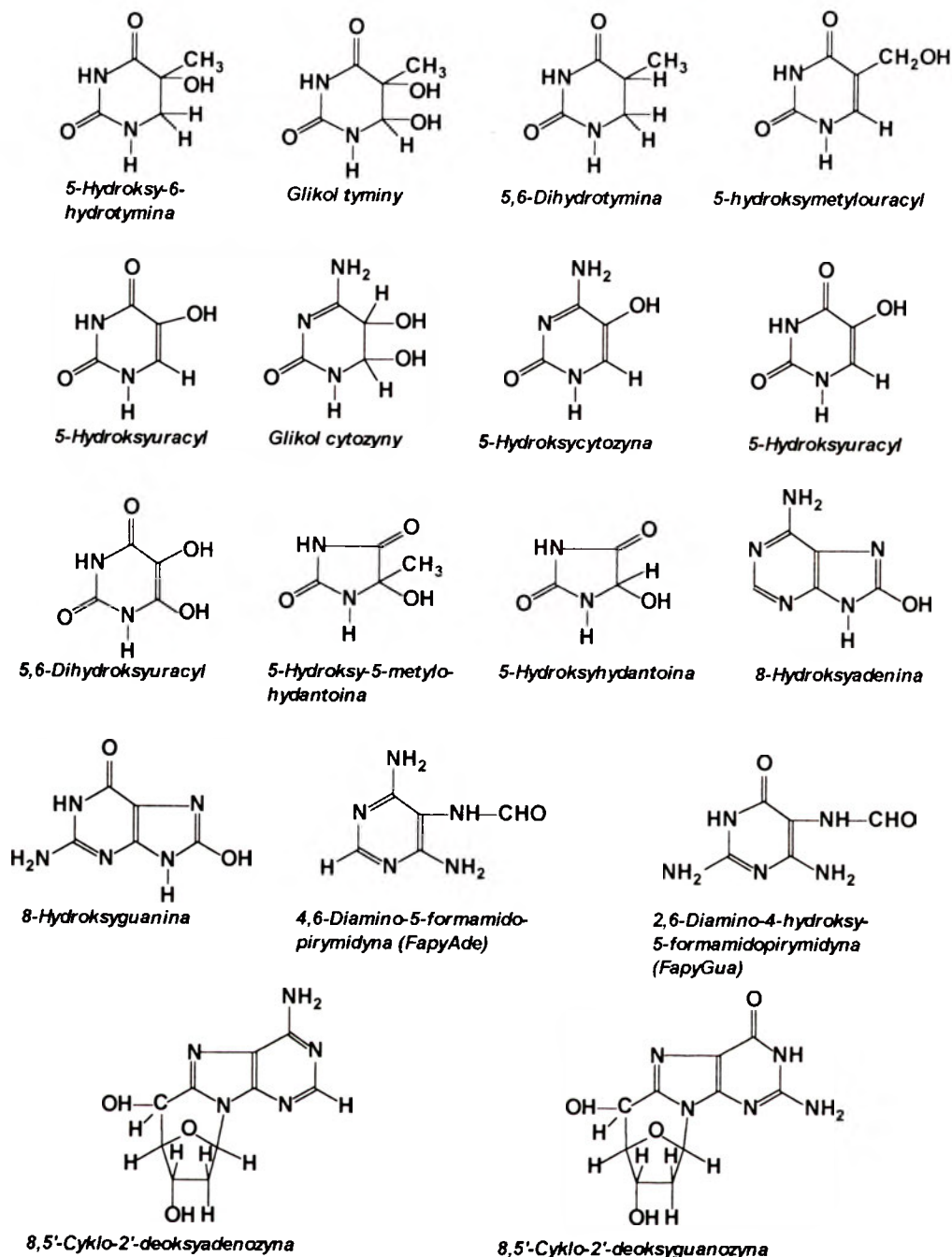
Mechanizm powstawania reaktywnych form tlenu oraz uszkodzenia DNA, powstające na skutek ich działania, były przedmiotem wielu wyczerpujących prac opublikowanych w ostatnim czasie [2-4]. Jednak molekularny mechanizm genotoksycznego działania wolnych rodników oraz udział w tym procesie poszczególnych produktów reakcji aktywnych form tlenu z DNA, nadal oczekują na pełne wyjaśnienie. Stwier-

dzono, że efekt genotoksyczny wywołują przede wszystkim rodnik hydroksylowy i tlen singletowy, w przeciwieństwie do rodnika ponadtlenkowego oraz nadtlenu wodoru [2-4]. Praktycznie każda ze składowych części DNA może być receptorem dla aktywnych form tlenu. Oblicza się, że w wyniku działania wolnych rodników na cząsteczkę DNA może powstać ok. 100 różnych rodzajów produktów oksydacji (Ryc. 1) [1,5-11].

Badania poziomu 8-OHGua w moczu wykazały, że w komórce szczura zachodzi około  $9 \times 10^4$  oksydacyjnych uszkodzeń cząsteczki DNA w ciągu jednego dnia [12]. Wysoki poziom uszkodzeń oksydacyjnych w DNA prowadzi do bloku lub spowolnienia replikacji. Zjawisko to obserwuje się przede wszystkim w wyniku nagromadzenia się w cząsteczce DNA niektórych oksydowanych pochodnych zasad azotowych jak np. glikolu tyminy, mocznika oraz na skutek pojawienia się miejsc apurynowych i apirymidynowych (AP) [9-11]. Ominięcie bloku przez mechanizmy transkrypcji następuje na ogół w wyniku indukcji systemu SOS, ale często kosztem misinkorporacji zasad [11-13]. Na przykład 8-hydroksyguanina indukuje transwersję typu G→T, natomiast glikol tyminy tranzycję T→C. Ponadto, wykazano, że uszkodzenia takie jak 7-hydro-8-oksyguanina i produkt deaminacji cytozyny – uracyl są omijane w procesie replikacji oraz błędnie odczytywane przez mechanizmy transkrypcji [1,6 14-17].

Dzięki wykształceniu się w procesie ewolucji odpowiednich dróg metabolicznych, ilość oksydacyjnie zmodyfikowanych zasad w DNA, w warunkach fizjo-

\* Dr, Katedra i Zakład Biochemii Klinicznej AM im. Ludwika Rydygiera, 85-094 Bydgoszcz, ul. Karłowicza 24



Ryc. 1 Niektóre końcowe produkty reakcji wolnych rodników tlenowych z zasadami azotowymi.

logicznych, utrzymywana jest na stałym dla danego osobnika poziomie. W komórkach *E. coli* funkcjonują przynajmniej trzy wzajemnie uzupełniające się mechanizmy, których działanie prowadzi do redukcji ilości oksydowanych zasad azotowych w DNA;

I. Hydroliza oksydacyjnie zmodyfikowanych trójfosforanów dezoksynukleotydów (m.in. w wyniku działania pirofosfatazy 8-oksydGTP kodowanej przez gen *mutT*).

II. Wycinanie zmodyfikowanych zasad azotowych z DNA przy udziale N-glikozylaz (białko FPG, glikozylaza uracylowa).

III. Usuwanie zmodyfikowanych zasad w procesie wycinania fragmentów polinukleotydów (UvrABC).

W komórkach ssaków uszkodzenia cząsteczki DNA mogą prowadzić do transformacji nowotworowej komórki jeśli modyfikacja będzie zlokalizowana w specy-

ficznych miejscach onkogenów. Szereg danych eksperymentalnych dowodzi, że procesy naprawy DNA stanowią istotny mechanizm zabezpieczający komórkę przed transformacją nowotworową. Z drugiej natomiast strony, wysoce efektywne mechanizmy naprawy DNA są niejednokrotnie ważnym czynnikiem odpowiedzialnym za ograniczoną skuteczność terapii przeciwnowotworowej.

W komórkach bakterii stwierdzono obecność kilku białek związanych z procesem usuwania oksydowanych zasad. Są to przede wszystkim:

— DNA-glikozylazy: glikozylaza formamidopirymidynowa (białko FPG) oraz glikozylaza uracylowa.

— endonukleazy: III, IV, VIII, egzonukleaza III,

Przypuszcza się, że w komórkach eukariotycznych funkcjonują podobne systemy enzymatyczne naprawiające oksydacyjnie zmodyfikowane zasady azotowe,

co zdają się potwierdzać, nieliczne jak dotąd dane eksperymentalne [18-22].

## II. DNA-Glikozylazy

Oksydacyjnie zmodyfikowane zasady azotowe mogą być wycięte z łańcucha DNA w wyniku hydrolizy wiązania N-glikozydowego łączącego zasadę z resztą cukrową. Stwierdzono obecność dwóch typów N-glikozylaz:

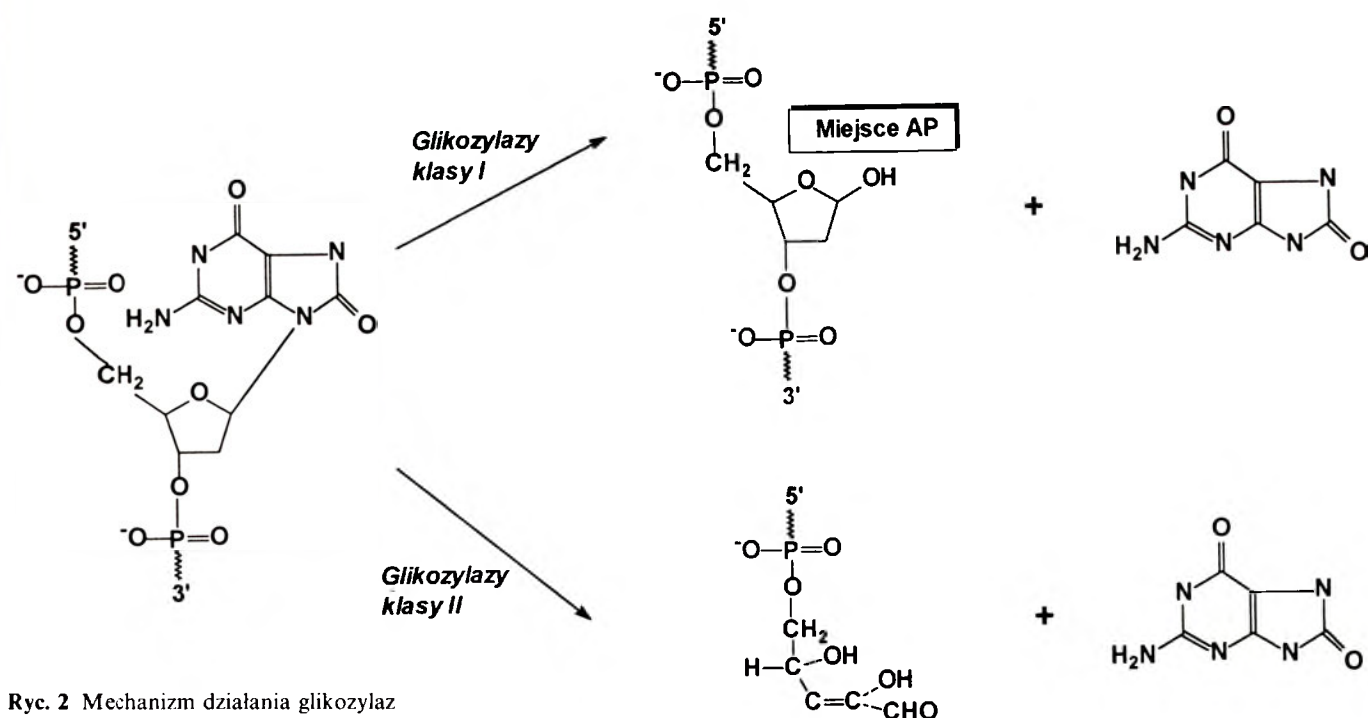
— glikozylazy typu pierwszego — mechanizm ich działania polega na hydrolizie wiązania N-glikozydowego. Prowadzi to do powstania w łańcuchu DNA miejsc apurynowych i apirymidynowych (Ryc. 2).

— glikozylazy drugiego typu nie tylko hydrolizują wiązanie N-glikozydowe, ale równolegle posiadają właściwości liazowe usuwają miejsca AP w drodze  $\beta$ -eliminacji. Jednym z produktów tej reakcji są wolne grupy aldehydowe na końcu 3' przeciętego łańcucha DNA, które, w dalszym etapie przemian, muszą zostać usunięte, ponieważ hamują syntezę naprawczą DNA (Ryc. 2). Miejsca pozbawione zasad (AP) powstają w DNA zarówno w wyniku aktywności glikozylazowej jak również pod wpływem spontanicznej hydrolizy. Są one usuwane przez odpowiednie endonukleazy AP rozszczepiające wiązania fosfodiesterowe od końca 5' w bezpośrednim sąsiedztwie uszkodzenia (Ryc. 3.) [23]. Niektóre endonukleazy AP klasy II (np. endonukleazy III i IV z komórek *E. coli*) posiadają również aktywność 3' diesterazową w stosunku do łańcuchów deoksyrybozy. Poniżej opisano najlepiej poznane glikozylazy uczestniczące w procesie usuwania oksydacyjnie zmodyfikowanych zasad azotowych z DNA.

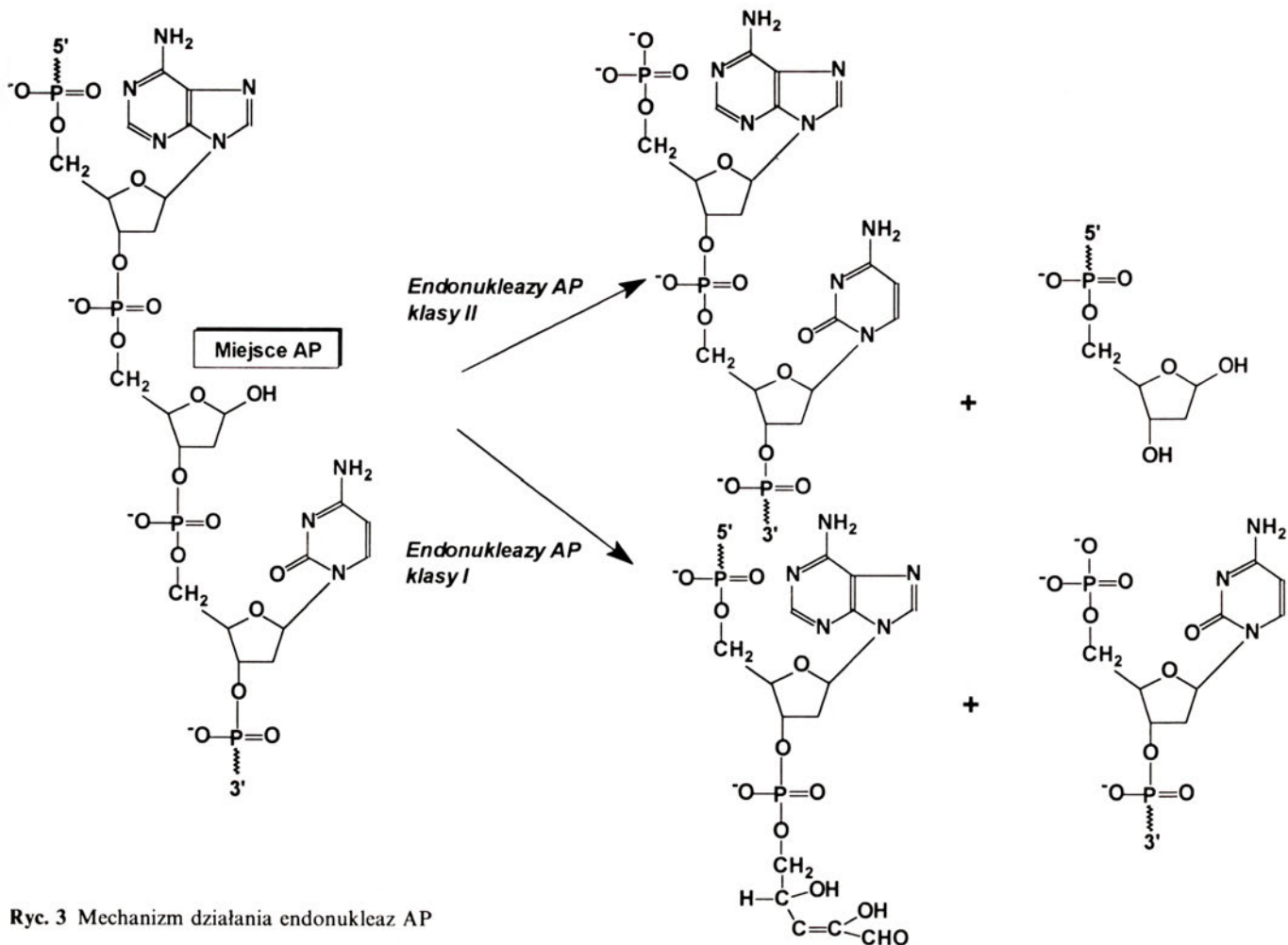
### II-1. Białko FPG

Obecność enzymów wycinających pochodne form-

amidopirymidynowe (Fapy-pochodne, Ryc. 1.) zasad azotowych z DNA stwierdzono u licznych szczepów bakterii, zarówno gram-dodatnich (*E. coli*, *Salmonella typhimurium*) jak i gram-ujemnych (*Micrococcus luteus*, *Bacillus subtilis* oraz *Lactococcus lactis*) [24, 25]. Również w komórkach *Bacillus firmus* wykazano obecność enzymu o strukturze homologicznej z glikozylazą formamidopirymidynową (FPG) z komórek *E. coli* i podobnej aktywności [26]. Dane porównawcze wykazują, że enzymy wycinające formamidopirymidynowe-pochodne zasad azotowych są wysoce konserwatywne ewolucyjnie. Najlepiej poznanym z wymienionych powyżej enzymów jest glikozylaza formamidopirymidynowa (białko FPG, produkt genu *mutM*). Białko to charakteryzuje się stosunkowo niskim poziomem ekspresji w komórce (100-200 cząsteczek/komórka) [27]. Stąd też analiza jego struktury stała się możliwa dopiero po sklonowaniu genu *jpg* i uzyskaniu szczepów bakterii o wysokim stopniu nadprodukcji enzymu [27, 28]. Białko FPG jest globularnym monomerem o masie cząsteczkowej 30,2 kDa, zbudowanym z 269 aminokwasów [28]. Metodą spektrometrii absorpcji atomowej wykazano, że na cząsteczkę białka przypada jeden atom cynku. Analiza struktury doprowadziła do opracowania modelu C-końcowej domeny FPG, w której cynk połączony jest z czterema cząsteczkami cysteiny (Ryc. 4.). Badania kompetycyjne dowiodły, że w prezentowanej na rycinie 4 domenie białka FPG, mogą być wiązane również jony innych metali; Cu(II), Cd(II), Hg(II), i Zn(II) [24]. Konkurują one ze sobą o miejsce wiązania z białkiem [29]. Przypuszczalną funkcją prezentowanej powyżej domeny jest rozpoznawanie uszkodzenia i wiązanie się z cząsteczką DNA. Obecność podobnej struktury palca cynkowego uczestniczącej w rozpoznawaniu uszkodzenia DNA stwierdzono również w cząsteczce białka *uvrA* [30]. Mutacja punktowa prowadząca do zastąpienia której-



Ryc. 2 Mechanizm działania glikozylaz

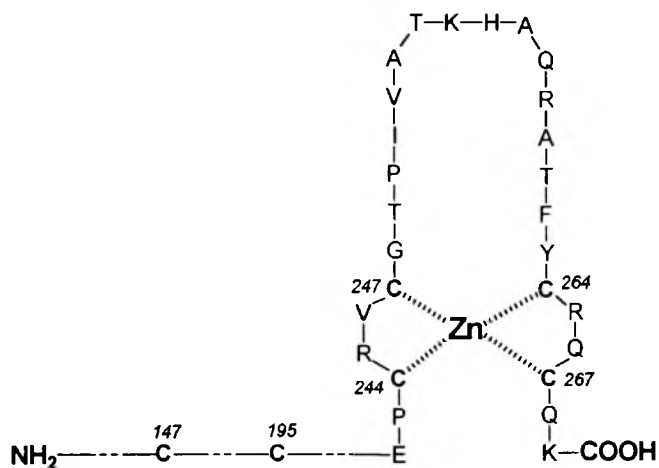


Ryc. 3 Mechanizm działania endonukleaz AP

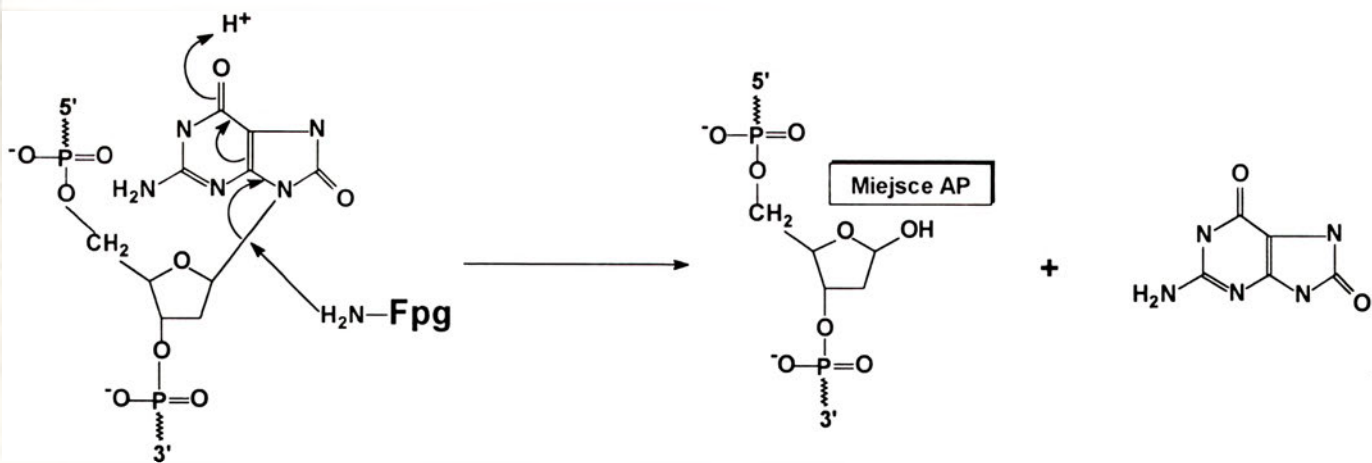
kolwiek z czterech cystein C-końcowej domeny FPG glicyną nie tylko prowadzi do braku aktywności FPG, ale uniemożliwia również wiązanie się enzymu z substratem [29, 31]. Białko to wykazuje działanie N-glikozylazowe (Ryc. 5 i Ryc. 6.), jednak odmienne niż obserwowane w przypadku endonukleazy III, gdzie proces ten zachodzi w drodze  $\beta,\gamma$ -eliminacji [32]. Trzecią aktywnością tego enzymu jest aktywność 5'-deoksyrybodiesterazowa, która również związana jest z domeną palca cynkowego.

Białko FPG początkowo zidentyfikowano jako enzym usuwający z DNA pochodne guaniny, posiadające otwarty pierścień imidazolowy [33] (Ryc. 1). Powstają

one zarówno jako produkty rozpadu metylowanych pochodnych puryn oraz jako końcowe metabolity przemian wolnorodnikowych (wyczerpujące informacje dotyczące przemian wolnorodnikowych zasad azotowych znajdzie czytelnik w następujących pozycjach; [1, 7, 34-36]). Jak wynika z przeprowadzonych ostatnio badań, prawdopodobnie jego najistotniejszą funkcją jest usuwanie z DNA 7-hydro-8-oksoguaniny w ramach systemu naprawy mutMTY [37]. Pierwotnie przypuszczano, że pochodne puryn posiadające pierścień imidazolowy nie są rozpoznawane przez FPG [38, 39]. Stwierdzono, że enzym ten może również naprawiać fapy-adeninę powstającą w kwasie poli-deoksyadenylowym pod wpływem promieniowania  $\gamma$  [40]. Kompleksowe badania przeprowadzone przy zastosowaniu GC/MS dostarczyły szeregu nowych danych dotyczących aktywności białka FPG [41]. Badano możliwość usuwania 13 głównych produktów powstających z puryn i pirymidyn w DNA pod wpływem promieniowania gamma. Wykazano, że żadna z badanych pirymidynowych pochodnych zasad nie jest rozpoznawana przez FPG. Ponadto stwierdzono, że obecność otwartego pierścienia imidazolowego nie jest jedyną determinantą rozpoznawaną przez ten enzym [41, 42]. Sugeruje się, że jego działanie może również być stymulowane przez zmiany konformacyjne cząsteczki DNA powstające w miejscu gdzie zlokalizowane są oksydacyjnie zmodyfikowane zasady [43]. Dowo-



Ryc. 4 Struktura C-końcowej domeny białka FPG



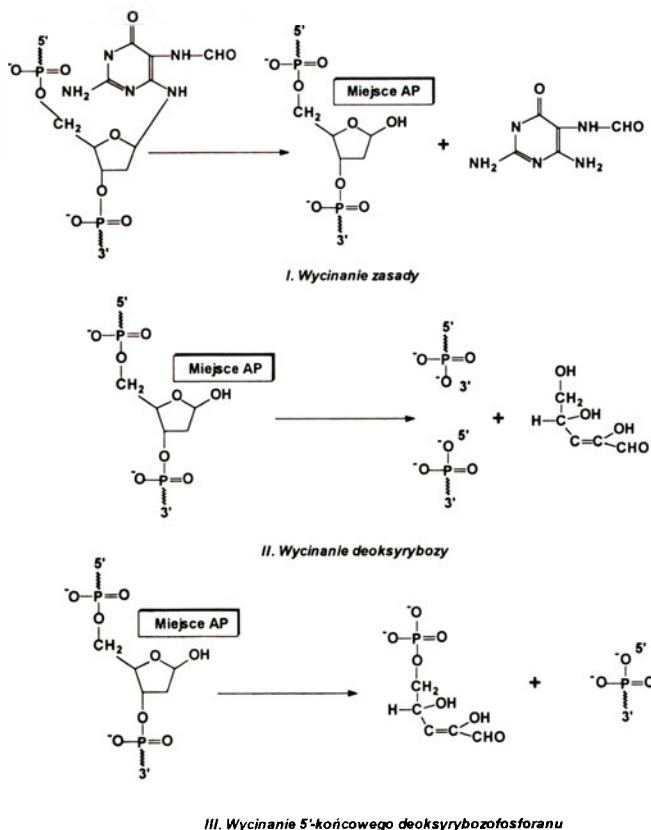
Ryc. 5 Mechanizm glikozylazowego działania białka FPG proponowany przez Groisman i wsp. [118].

dów na indukcję zmian strukturalnych cząsteczki DNA pod wpływem oksydacyjnych modyfikacji zasad azotowych dostarczyły najnowsze badania konformacyjne [44]. Dużym zaskoczeniem było doniesienie, w którym wykazano aktywność FPG w stosunku do 5-OHdU oraz 5-OHdC [45]. Udowodniono również, że FPG z podobną wydajnością jak endonukleaza III usuwa z DNA dihydrodeoksytyminę [42].

Obecność enzymów o aktywności podobnej do produktu genu *mutM* stwierdzono również u eukariota, w komórkach drożdży *Saccharomyces cerevisiae* [46]. Częściowo oczyszczony preparat enzymu posiadającego aktywność N-glikolazy o masie cząsteczkowej 30 kDa uzyskano również z grasicy cielęcej, jego aktywność była niezależna od obecności czynników chelatujących [47]. Enzym usuwający z DNA 8-oksoguaninę wykryto również w komórkach neutrofilii ludzkich [48].

## II-2. Glikozylaza uracylowa (UDG)

Glikozylaza uracylowa z komórek *E. coli* (UDG) jest monomerycznym białkiem o stosunkowo niewielkich rozmiarach (25,6 kDa) i dobrze poznanej strukturze. Podstawową aktywnością UDG jest wycinanie z cząsteczki DNA uracylu, poprzez hydrolizę wiązania N-glikozydowego. UDG wycina uracyl zarówno z jednok i dwuniciowych cząsteczek DNA. Do swej aktywności nie wymaga obecności jonów metali [49]. W przeciwieństwie do endonukleazy III i FPG, glikozylaza uracylowa nie wykazuje aktywności liazowej [50]. Do niedawna przypuszczano, że jedynym substratem dla tego enzymu jest deoksyurydina oraz 5-fluoro-2'-deoksyurydina. Nie stwierdzono aktywności UNG w stosunku do 5-bromo-2'-deoksyurydyny i 2'-rybourydyny [50, 51]. Najnowsze doniesienia dowiodły, że spektrum substratowe glikozylazy uracylowej jest znacznie szersze niż początkowo przypuszczano. Poza uszkodzeniami wymienionymi powyżej, glikozylaza uracylowa może również rozpoznawać i wycinać niektóre produkty rodnika hydroksylowego z zasadami azotowymi. Hatahet i wsp. [45] stosując jako substrat dla UNG oligonukleotydy zawierające 5-hydroksy-2'-deoksyurydynę wykazali że enzym ten usuwa z DNA 5-hydroksyuracyl. W kolejnej pracy [52], podjęto próbę ustalenia, które z kilkunastu głównych produktów oksydacji zasad powstających w DNA pod wpływem promieniowania gamma są wycinane przez glikozylazę uracylową. Roztwór naświetlonego DNA inkubowano z aktywną glikozylazą uracylową. Wykazano, że glikozylaza uracylowa rozpoznaje i wycina z DNA kwas izodialurowy (przekształcający się podczas wycinania w 5,6-dihydrouracyl — formę oznaczaną ostatecznie techniką GC/MS). Nie stwierdzono przy tym aktywności UNG w stosunku do piętnastu innych produktów oksydacji puryn i pirymidyn oznaczanych jednocześnie przy zastosowaniu GC/MS. W cytowanej pracy, po inkubacji naprawczej z glikozylazą uracylową obserwowano zarówno obniżenie się poziomu kwasu izodialurowego w naświetlanych cząsteczkach DNA z jednoczesnym wzrostem stężenia wolnego produktu w mieszaninie



Ryc. 6 Główne reakcje katalizowane przez białko FPG

reakcyjnej [52]. Badania kinetyczne pozwoliły również na określenie rzędowości reakcji i wyznaczenie stałej  $K_m$  dla tego procesu [52]. Wycinanie kwasu izodialurowego z DNA przez glikozylazę uracylową wskazuje, że obecność pierścienia aromatycznego nie jest jedyną determinantą rozpoznawaną przez ten enzym. Praca ta nie potwierdziła wyników H a t a h e t i w s p. [45] które wykazywały, że UNG wycina z DNA 5-hydroksyuracyl.

Powstawanie kwasu izodialurowego w DNA stwierdzono *in vivo*, jak i *in vitro* w wyniku reakcji rodnika hydroksylowego z cytozyną lub też na skutek oddziaływania DNA ze związkami o działaniu oksydującym [53-57]. Jak dotąd nie są znane biologiczne konsekwencje obecności kwasu izodialurowego w DNA. Jednak istnienie w komórkach enzymu usuwającego go z DNA, wskazuje, że może on być przyczyną bloku replikacji lub błędnej transkrypcji.

### II-3. Glikozylaza hipoksantynowa

Dezaminacja adeniny w DNA prowadzi do powstania hipoksantyny, która może łączyć się wiązaniami wodorowymi z cytozyną, co może być przyczyną mutacji typu tranzycji z A:T do G:C. Obecność enzymu usuwającego hipoksantynę z DNA stwierdzono zarówno w komórkach *E. coli* [58, 59], jak i eukariotycznych [60]. Enzym ten został wyizolowany i częściowo oczyszczony [58, 60]. *In vitro* glikozylaza hipoksantynowa usuwa deaminowaną adeninę z pojedynczych par I:T [61]. Jak dotąd nie stwierdzono, by enzym ten wycinał inne błędnie sparowane zasady [61].

Badania S a p a r b a e v i w s p. [62] wykazały identyczną specyficzność substratową i współoczystanie glikozylaz N-metylopuryn z *E. coli* (AlkA), drożdży (MAG), szczura (ADPG) i człowieka (ANPG) z glikozylazami hipoksantynowymi tych organizmów. Niewykluczone zatem, że aktywność enzymatyczna opisywana dotąd jako glikozylaza hipoksantynowa jest nieodkrytą właściwością glikozylaz N-metylopuryn. Również, brak jest jednoznacznych danych literaturowych wskazujących, że białka identyfikowane jako glikozylazy hipoksantynowe, poza hipoksantyną mogą usuwać inne zmodyfikowane zasady, choć nie można tej ewentualności wykluczyć.

## III. Nukleazy uczestniczące w usuwaniu oksydowanych pochodnych zasad azotowych

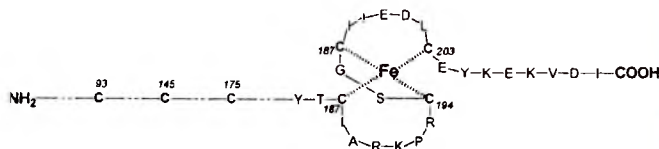
### III-1. Endonukleaza III — białko NTH

Początkowo aktywność endonukleazy III identyfikowano ze zdolnością do naprawy DNA poddanego działaniu wysokich dawek promieniowania ultrafioletowego (254 nm) [63]. W tych warunkach, głównie generowane są cyklobutadipiryminy, jednak stwierdzono również możliwość powstawania innego typu uszkodzeń jak np. glikolu tyminy oraz miejsc AP [64, 65].

Oczyszczoną endonukleazę III otrzymano z komórek *E. coli* [63]. Jednak dokładna charakterystyka struktury oraz poznanie właściwości katalitycznych endonukleazy III stało się możliwe dzięki amplifikacji genu *nth* kodującego ten enzym [66]. Jest to monomeryczne białko o masie 23 KD, zbudowane z 211 aminokwasów, posiadające punkt izoelektryczny przy pH 10 [63, 66]. Zastosowanie elektronowego rezonansu paramagnetycznego pozwoliło na poznanie szczegółów dotyczących jego struktury [67]. Centrum aktywne białka Nth utworzone jest przez pętlę 30 aminokwasów stabilizowaną przez atom żelaza [67]. Jego obecność jest warunkiem koniecznym zachowania aktywności katalitycznej endonukleazy III [68, 69] (Ryc. 7.). Jak widać na rycinach 4 i 7, domeny centrum aktywnego endonukleazy III oraz białka FPG wykazują duże podobieństwo strukturalne.

Endonukleaza III jest enzymem o aktywności glikozylazy DNA i wykazuje powinowactwo do kilku produktów oksydacji zasad azotowych, takich jak glikol tyminy, 5,6-dihydroksytymina, glikol uracylu, 5,6-dihydroksyuracyl oraz 5-hydroksy-6-hydrouacyl (Ryc. 1.) [40, 64, 70-72]. Stwierdzono również jej aktywność w stosunku do miejsc AP, niezmodyfikowanych oraz alkilowanych hydroksyloaminą [73]. Mechanizm działania endonukleazy III jest dwuetapowy. W pierwszym etapie następuje rozpad wiązań N-glikozydowych, po czym  $\beta$ -eliminacja w wyniku aktywności liazowej [74, 75].

Początkowo przypuszczano, że determinantą rozpoznawaną przez endonukleazę III jest uszkodzenie pierścienia heterocyklicznego zasad azotowych (Ryc. 1.). Sugestię tę poparto rezultatami badań w których wykazano, że produkty oksydacji zasad azotowych posiadające nienaruszony pierścień pirymidynowy, takie jak np. 5-hydroksymetylouracyl nie były rozpoznawane przez endonukleazę III [76, 77]. Jednak późniejsze badania przeprowadzone przez H a t a h e t i w s p. [45] zdają się temu przeczyć. W cytowanej pracy udowodniono, że 5-OHdC i 5-OHdU posiadające pierścień heterocykliczny są usuwane z DNA przez ten enzym. Zdaniem autorów [45], elementem umożliwiającym rozpoznanie zmodyfikowanej zasady o nienaruszonych pierścieniach, przez endonukleazę III, jest obecność podstawnika w pozycji 5 o odpowiednio dużych rozmiarach sferycznych. Kolejne badania dostarczyły dowodów, że endonukleaza III może wycinać z DNA pochodną tyminy — 5-hydroksy-6-hydroksytyminę, oraz cztery pochodne cytozyny, 5,6-dihydroksyuracyl, alloksan, 5-hydroksy-6-hydrouacyl i glikol uracylu [78]. Wyniki cytowanej pracy zdają się potwierdzać hipotezę w której zakładano, że determinan-



Ryc. 7 Struktura C-końcowej domeny białka NTH

tą rozpoznawaną przez endonukleazę III jest zanik planarności cząsteczki, co następuje w wyniku powstania pojedynczego wiązania w pozycji 5-6 [40, 70].

Porównanie danych dotyczących struktury oraz aktywności enzymatycznej białek NTH i FPG, wskazują, że pomimo różnic w sekwencji aminokwasów, pełnią one podobną funkcję. Nie można zatem wykluczyć ich wspólnego pochodzenia. Konserwatywny ewolucyjny obu enzymów stwierdzony w badaniach porównawczych pomiędzy różnymi organizmami, wskazuje, że odgrywają one istotną rolę w utrzymaniu funkcjonalności genomu. Funkcją białek NTH i FPG jest zabezpieczenie komórek *E. coli* przed letalnym i mutagennym efektem działania oksydacyjnych uszkodzeń DNA. Uzupełniając się wzajemnie enzymy te mogą usunąć większość wolnorodnikowych uszkodzeń DNA powstających po działaniu promieniowania jonizującego oraz czynników oksydujących.

### III-2. Egzonukleaza III

Jest to monomeryczne białko o masie cząsteczkowej 28 kDa, wymagające do swej aktywności enzymatycznej obecności jonów magnezu [49, 79].

Egzonukleaza III łączy w sobie kilka różnych aktywności związanych z procesem naprawy DNA [49, 79]. Pierwszą z nich, było zaobserwowane przez Richardson i wsp. [80] działanie egzonukleolityczne od końca 3' do 5'. Ponadto enzym ten posiada aktywność 3'-fosfomonoesterazową [80, 81] oraz 3'-fosfodiesterazową [82]. W komórkach *E. coli* jest głównym enzymem rozpoznającym i usuwającym miejsca AP, poprzez hydrolizę wiązania fosfodiesterowego bezpośrednio przy pozycji 5' miejsca AP [81, 83], czyli identycznie, jak w przypadku endonukleazy IV. Enzym ten rozszczepia również wiązanie 5' deoksyrybozy połączonej z moczniakiem. Wykazano także RN-azowe właściwości egzonukleazy III [84]. Zarówno egzonukleaza III jak i endonukleaza IV usuwają miejsca AP powstające nie tylko na skutek wycinania uszkodzonych zasad przez N-glikozylazy, ale również inicjują naprawę utlenionych miejsc AP i fragmentów deoksyrybozy wytworzonych w wyniku ataku wolnych rodników.

Mutanty nie posiadające egzonukleazy III (*xthA*-) są wysoce wrażliwe na działanie nadtlenu wodoru, MMS i promieniowanie UV [82], jednak właściwości tej nie towarzyszy podwyższona wrażliwość na działanie promieniowania gamma [85]. Przyczyną nadwrażliwości komórek *xthA*- na działanie promieniowania UV jest kumulacja dużej ilości nienaprawionych pęknięć łańcucha DNA. Wynika to stąd, że egzonukleaza III prawdopodobnie aktywuje końce 3' pękniętego łańcucha, czyniąc je w ten sposób substratami dla DNA polimerazy I [82]. Stwierdzono również, podwyższoną wrażliwością mutantów *xthA*- na działanie monofunkcyjnych związków alkilujących, które modyfikują zasady, ulegające następnie spontanicznej

depurynacji lub wycinane przez glikozylazy [85]. W związku z tym przypuszcza się, że egzonukleaza III uczestniczy również w naprawie uszkodzeń rozpoznawanych również przez glikozylazy [50].

### III-3. Endonukleaza IV

Białko będące produktem genu *nfo*, zostało początkowo opisane jako enzym posiadający aktywność AP-endonukleazy [86]. Nie stwierdzono udziału endonukleazy IV w naprawie uszkodzeń powstających pod wpływem promieniowania UV. Uzyskane w późniejszych latach mutanty nie posiadające aktywnej endonukleazy IV były nadwrażliwe na oksydacyjne działanie wodoronadtlenku *tert*-butylu oraz bleomycyny. Natomiast podwójne mutanty z nieaktywną endonukleazą IV i egzonukleazą III, charakteryzowała dodatkowo nadwrażliwość na H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, MMS i mitomycynę C, co było związane ze specyficznością działania egzonukleazy III. Charakterystycznym dla podwójnych mutantów była przede wszystkim nadwrażliwość na działanie promieniowania gamma [85]. Jak wiadomo, zarówno obecność bleomycyny, jak i wodoronadtlenku *tert*-butylu prowadzi do powstawania rodnika hydroksylowego, który wywołuje oksydacyjne uszkodzenia zasad azotowych w DNA [87, 88]. Stąd też przypuszcza się, że endonukleaza IV uczestniczy w ich naprawie. Potwierdzeniem tej hipotezy może być również fakt, że inne czynniki uczestniczące w generowaniu rodników ponadtlenujących — paraquat i menadion, mogą indukować jednocześnie nadprodukcję tego enzymu w komórkach [89]. Transformacja plazmidu posiadającego wielokrotne kopie genu *nfo*, połączona z indukowaną nadprodukcją endonukleazy IV pozwoliła na oczyszczenie tego białka do stanu homogenności. Umożliwiło to późniejszą szczegółową charakterystykę jego właściwości fizykochemicznych oraz katalitycznych [90]. Cytowani autorzy wykazali, że endonukleaza IV, podobnie jak egzonukleaza III jest nie tylko AP-endonukleazą i 3'-diesterazą ale działa również jako 3'-fosfataza. Analiza struktury endonukleazy IV wykazała, że jest ona metaloproteiną silnie związaną z atomami cynku i manganu [91]. Jak dotąd nie wiadomo, czy obecność atomów tych metali w cząsteczce związana jest z utrzymaniem struktury białka, czy też bezpośrednio uczestniczą one w procesach katalitycznych. Stwierdzono, że usunięcie jonów metali z cząsteczki (poza silnie związanym atomem cynku) prowadzi do utraty aktywności, która może zostać przywrócona przez dodanie do roztworu enzymu jonów manganu lub kobaltu. Jednak dodanie samych jonów cynku nie przywraca aktywności endonukleazy IV [91]. Pomimo, że procesy naprawy DNA katalizowane zarówno przez endonukleazę IV jak i egzonukleazę III, *in vitro* mogą indukować syntezę naprawczą DNA uszkodzonego działaniem nadtlenu wodoru, to nadprodukcja endonukleazy IV w komórkach *xthA*- nie przywraca

oporności na działanie  $H_2O_2$  [82, 92]. Sugeruje to, że enzymy te *in vivo* rozpoznają specyficzne dla siebie uszkodzenia DNA. Dowodów na poparcie tej hipotezy dostarczyły badania wykazujące, że obecność endonukleazy IV efektywniej niż egzonukleazy III, przyczynia się do aktywacji primerów terminalnych DNA chromosomalnego komórek *nfo*- traktowanych bleomycyną [91].

### III-4. Endonukleaza VIII

Jak dotąd niewiele wiadomo na temat struktury i funkcji endonukleazy VIII. Jest to białko o masie cząsteczkowej ok. 29 kDa, wymagające do aktywności, podobnie jak endonukleaza III, jonów sodu i magnezu [93].

Mutanty *E. coli* posiadające nieaktywną endonukleazę III (*nth*-), nie posiadały podwyższonej wrażliwości na działanie promieniowania X [94]. Wskazywało to na istnienie, alternatywnego procesu usuwania z DNA takich produktów oksydacji zasad jak glikol tyminy, czy mocznik [95, 96]. Melamed i wsp. [93] zasugerowali, że endonukleaza VIII może zastępować funkcje endonukleazy III w przypadku braku tego enzymu w komórce. Cytowani autorzy wykazali, że enzym ten posiada aktywność N-glikozyłazy oraz endonukleazy AP klasy I (Ryc. 3.). Wykazano, ponadto, że substratem dla tego enzymu są cząsteczki DNA zawierające mocznik, glikol tyminy i 5,6-dihydrouracyl [93]. Jednak jak dotąd nie badano możliwości usuwania z DNA innych oksydacyjnie zmodyfikowanych zasad. Aktywności takiej można oczekiwać, jeśli istotnie enzym ten przejmuje funkcje białka NTH w komórkach mutantów *nth*-.

Istnienie w komórkach *E. coli* enzymów dublujących się wzajemnie wykazywano już wielokrotnie. Na przykład; dwie glikozyłazy 3-metyloadeninowe, produkty genów *tag* i *alkA*, dwie metylotransferazy — produkty genów *ada* i *ogt* [97] oraz endonukleazy AP — białka XTH i NFO [98]. Interesującym jest, że jeden z enzymów wymienionych par jest enzymem konstytutywnym, drugi natomiast — indukcyjnym.

### III-5. Endonukleaza V z bakteriofaga T4

Komórki *M. Luteus* i *E. coli* zainfekowane bakteriofagem T4 posiadają właściwość szybkiego nabywania oporności na działanie promieniowania UV. Stwierdzono w nich obecność specyficznego enzymu usuwającego z DNA dimery pirymidynowe [99]. Jest to stosunkowo małe monomeryczne białko zachowujące aktywność w obecności EDTA. Enzym ten nazywany endonukleazą V z bakteriofaga T4 (T4Endo V) hydrolyzuje wiązanie N-glikozydowe przy 5'-pirymidynie tworzącej dimer, oraz wiązanie fosfodiesterowe przy końcu 3' powstałego miejsca AP [99]. Wyniki dotychczasowych badań wykazały wysoką specyfikę T4Endo V w stosunku do produktów powstających pod wpływem promieniowania UV.

Celem sprawdzenia, czy enzym ten rozpoznaje oksydacyjne zmodyfikowane zasady azotowe, T4Endo V inkubowano z DNA naświetlanym promieniami gamma [100]. Następnie, podobnie jak w przypadku badań nad glikozyłazę uracylową, metodą GC/MS badano poziom 15 produktów oksydacji zasad. Wykazano, że endonukleaza V posiada również aktywność, polegającą na wycinaniu z DNA 4,6-diamino-5-formamidopirymidyny (FapyAde — Ryc. 1.). Nie stwierdzono jednocześnie zdolności usuwania innych zmodyfikowanych zasad oznaczonych tą metodą.

Wyniki cytowanej pracy, wskazują, że T4Endo V posiada zdolność naprawy nie tylko dimerów pirymidynowych, ale również w stosunku do modyfikacji typu monomerycznego. Jak wiadomo FapyAde jest także substratem dla białka FPG [41]. Jest to typowy produkt rodnika hydroksylowego z DNA [53, 101]. W jednej z najnowszych prac wykazano możliwość powstawania tej modyfikacji w DNA pod wpływem niskich dawek promieniowania ultrafioletowego (254 i 310 nm) [102]. Stwierdzono również, że FapyAde powstaje w DNA hodowli komórek eukariotycznych i zwierząt naświetlanych promieniami gamma lub poddanych działaniu czynników oksydujących [55-57, 103]. Podwyższony poziom tego związku wykazano także w chromatynie komórek nowotworów ludzkich [104, 105]. Jak dotąd nie jest znana biologiczna rola FapyAde. Jednakże obecność enzymu usuwającego ten produkt z DNA może pośrednio świadczyć o niekorzystnym jego wpływie na prawidłowość procesów związanych z funkcjonowaniem genomu.

### III-6. Kompleks enzymatyczny UvrABC-endonukleazy

Do niedawna powszechnie przyjmowano, że rozległe uszkodzenia DNA wywoływane działaniem związków chemicznych, takich jak np. N-acetoksy-2-acetyloaminofluoren naprawiane są przez enzymy wycinające nukleotydy. Podczas, gdy uszkodzenia wywołujące stosunkowo niewielkie zmiany struktury cząsteczki DNA usuwane są w wyniku aktywności glikozyłazowej [106]. U *E. coli* UvrABC-endonukleaza jest jednym z głównych enzymów funkcjonujących w systemie naprawy przez wycinanie. Kompleks ten wiąże się z uszkodzoną cząsteczką DNA i katalizuje proces hydrolizy wiązań fosfodiesterowych w sąsiedztwie uszkodzonego miejsca [106].

Struktura oraz mechanizm działania UvrABC-endonukleazy są stosunkowo dobrze poznane [106-109]. W niniejszej rozprawie ograniczono się jedynie do omówienia zagadnień związanych z funkcją tego enzymu w naprawie oksydacyjnie zmodyfikowanych zasad azotowych.

Mutanty posiadające nieaktywną nukleazę UvrABC wykazują podwyższoną aktywność na działanie promieniowania UV oraz związków alkilujących. Nie obserwuje się jednak podwyższonej wrażliwości



tych komórek na działanie promieniowania jonizującego oraz czynników utleniających. Pierwszym doniesieniem wskazującym na UvrABC-endonukleazę jako enzym usuwający oksydacyjnie zmodyfikowane zasady z DNA, była praca Nabben i wsp. [110]. Autorzy obserwowali obniżoną efektywność replikacji DNA faga  $\phi$ X174 naświetlanego promieniami gamma w mutantach bakterii posiadających nieaktywny kompleks UvrABC (*uvrA*- lub *uvrC*-). Potwierdzeniem wcześniejszych sugestii, że kompleks *uvrABC* naprawia przynajmniej niektóre z uszkodzeń rozpoznawanych przez egzonukleazę III, są doniesienia, w których stwierdzono letalny charakter potrójnej mutacji *uvrA-xth-nfo*-, jeśli komórki posiadające ją przetrzymywane są w warunkach tlenowych [111]. Szanse przeżycia tych komórek w atmosferze tlenu dawała obecność dodatkowego defektu — prowadząca do wyeliminowania aktywności glikozylazy uracylowej. Wskazuje to na letalne konsekwencje nagromadzenia się miejsc AP powstających w wyniku wycinania uracylu (lub innych uszkodzeń oksydacyjnych rozpoznawanych przez ten enzym). Badania *in vitro* wykazują, że UvrABC może rozpoznać zarówno miejsca AP, jak i glikol tyminy [73]. Jednak stwierdzono, że dihydrotymina nie jest substratem dla tego enzymu [73]. Prawdopodobnie, dwa inne produkty powstające pod wpływem aktywnych form tlenu — 8OHGua i Fapy-Gua, są również substratami dla UvrABC [112]. Wyniki te znalazły potwierdzenie również w badaniach *in vitro* przeprowadzonych przy zastosowaniu techniki GC/MS (bad. własne — dane nie publikowane).

#### IV. Podsumowanie

W komórkach prokariotycznych funkcjonuje wiele enzymów usuwających z DNA oksydowane pochodne zasad azotowych. Stanowią one jeden z mechanizmów zabezpieczających komórki przed genotoksycznym efektem działania aktywnych form tlenu. Obecność podobnych enzymów stwierdzono również w komórkach eukariotycznych [21, 47, 48]. Jak wiadomo, działanie aktywnych form tlenu ma charakter mutageny [15, 16, 113, 114]. Trudno jednak twierdzić jednoznacznie, czy obecność oksydacyjnie zmodyfikowanych zasad w DNA prowadzi do procesu karcynogenezy. Przemawiają za tym opublikowane ostatnio dane eksperymentalne [104, 105, 115-117]. Jeśli tak jest istotnie, to defekty w naprawie oksydowanych pochodnych zasad azotowych mogą prowadzić do podwyższenia ryzyka rozwoju choroby nowotworowej. Z drugiej natomiast strony oporność nowotworów na terapię opartą na lekach indukujących powstawanie aktywnych form tlenu (np. bleomicyna) oraz wykorzystującą promieniowanie jonizacyjne, może być uwarunkowana podwyższoną efektywnością naprawy DNA. Zjawisko to w znacznym stopniu ogranicza skuteczność terapii. Stąd też, w ostatnich latach, obserwuje się wzrastające zainteresowanie pro-

cesami naprawy DNA w aspekcie klinicznym. Duże znaczenie terapeutyczne mogą mieć również dane porównujące kinetykę tworzenia i usuwania oksydacyjnych uszkodzeń zasad azotowych z efektywnością radio- i chemioterapii.

#### Podziękowanie

Praca finansowana z grantu KBN 4 PO5A.121.08

Artykuł otrzymano 26 lipca 1995 r.

Zaakceptowano do druku 5 grudnia 1995 r.

#### Piśmiennictwo

- Halliwell B, Gutteridge JMC (1989) W: Free radicals in biology and medicine, Oxford: Second Edition, Clarendon Press
- von Sonntag C (1987) W: The chemical basis of radiation biology, New York: Taylor & Francis
- Aruoma OI, Kaur H, Halliwell B (1991) *J R Soc Health* **111**: 172-177
- Halliwell B, Aruoma OI (1991) *FEBS Lett* **281**: 9-19
- Vuillaume M (1987) *Mutat Res* **186**: 43-72
- Breimer LH (1990) *Mol Carcinogenesis* **3**: 197
- Schulte-Frohlinde D, von Sonntag C (1990) W: Wallace SS, Painter P (red) Ionizing radiation damage to DNA: molecular aspects, Wiley-Liss, str 31-42
- Dizdaroglu M (1991) *Free Radical Biol Med* **10**: 225-242
- Epe B (1991) *Chem Biol Interact* **80**: 239-260
- Piette J (1991) *J Photochem Photobiol* **11**: 241-260
- Demple B (1991) *Annu Rev Genet* **25**: 315-337
- Fraga CG, Shigenaga MK, Park JW, Degan P, Ames BN (1990) *Proc Natl Acad Sci USA* **87**: 4533-4537
- Adelman R, Saul RL, Ames B (1988) *Proc Natl Acad Sci USA* **85**: 2706-2708
- Farr SB, Kogoma T (1991) *Microbiol Rev* **55**: 561-585
- Moreas EC, Keyse SM, Tyrrell RM (1990) *Carcinogenesis* **11**: 283-293
- Cheng KC, Cahill DS, Kasai H, Nishimura S, Loeb LA (1992) *J Biol Chem* **267**: 166-172
- Wood ML, Dizdaroglu M, Gajewski E, Essigmann JM (1990) *Biochemistry* **29**: 7024-7032
- Popoff SC, Spira AI, Johnson AW, Demple B (1990) *Proc Natl Acad Sci USA* **87**: 4193-4197
- Ramotar D, Popoff SC, Gralla EB, Demple B (1991) *Mol Cell Biol* **11**: 4537-4544
- Demple B, Herman T, Chen DS (1991) *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 11450-11454
- Bessho T, Tano K, Kasai H, Ohtsuka E, Nishimura S (1993) *J Biol Chem* **268**: 19416-19421
- Bessho T, Roy R, Yamamoto K, Kasai H, Nishimura S, Tano K, Mitra S (1993) *Proc Natl Acad Sci USA* **90**: 8901-8904
- Lindhal T, Nyberg B (1992) *Biochemistry* **11**: 3610-3617
- Boiteux S, Lemaire MA, Laval J (1990) W: Wallace SS, Painter P (red) Ionizing radiation damage to DNA, Wiley-Liss str 89-96
- Duwat P, Erlich SD, Gruss A (1992) *Appl Environ Microbiol* **58**: 2674-2678
- Ivey DM (1990) *Nucleic Acids Res* **18**: 5882
- Boiteux S, O'Connor TR, Lederer F, Gouyette A, Laval J (1990) *J Biol Chem* **265**: 3916-3922
- Boiteux S, O'Connor TR, Laval J (1987) *EMBO J* **6**: 3177-3183
- O'Connor TR, Graves RJ, de Murcia G, Castaing B, Laval J (1993) *J Biol Chem* **268**: 9063-9070
- Husain I, Van Houten B, Thomas DC, Sancar A (1986) *J Biol Chem* **261**: 4895-4901
- Castaing B, Geiger A, Seliger H, Nehls P, Laval J, Zelwer C, Boiteux S (1993) *Nucleic Acids Res* **21**: 2899-2905
- Bailly V, Verly WG, O'Connor T, Laval J (1989) *Biochem J* **262**: 581-589

33. Boiteux S, Bichara M, Fuchs RPP, Laval J (1989) *Carcinogenesis* **10**: 1905-1909
34. Tudek B (1993) *Post Biochem* **39**: 91-99
35. Akman SA, Forrest GP, Doroshov JH, Dizdaroglu M (1991) *Mutat Res* **261**: 123-130
36. Ramator D, Demple BW (1993) W: Halliwell B, Aruoma OI (red) DNA and free radicals (red) New York, Ellis Horwood, str 165-191
37. Michaels ML, Cruz C, Grollman AP, Miller JH (1992) *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 7022-7025
38. Boiteux S, Bellene J, Roques BP, Laval J (1984) *Nucleic Acids Res* **12**: 5429-5439
39. Laval J, Lopes F, Madelmont JC, Godeneche D, Meyniel G, Habraken Y, O'Connor TR, Boiteux S (1991) *IARC Sci Publ* 412-416
40. Breimer LH (1984) *Nucleic Acids Res* **12**: 6359-6367
41. Boiteux S, Gajewski E, Laval J, Dizdaroglu M (1992) *Biochemistry* **31**: 106-110
42. Tchou J, Kasai H, Shibutani S, Chung MH, Laval J, Grollman AP, Nishimura S (1991) *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 4690-4694
43. Kouchakdjian M, Bodepudi V, Shibutani S, Eisenberg M, Johnson F, Grollman AP, Patel DJ (1991) *Biochemistry* **30**: 1403-1412
44. Misakiewicz K, Miller J, Ornstein R, Osman R (1994) *Biopolymers* **35**: 113-124
45. Hatahet Z, Kow YW, Pural AA, Cunningham RP, Wallace SS (1994) *J Biol Chem* **269**: 18814-18820
46. Boiteux S (1993) *J Photochem Photobiol B* **19**: 87-96
47. Laval J, O'Connor TRO, D'Herin-Lagravera C, van der Kamp AP, Boiteux S (1990) W: Lambert MW, Laval J (red) DNA repair mechanisms and their biological implication in mammalian cells, New York, str 25-36
48. Chung MH, Kim HS, Ohtsuka E, Kasai H, Yamamoto F, Nishimura S (1991) *Biochem Biophys Res Commun* **178**: 1472-1478
49. Lindahl T (1982) *Annu Rev Biochem* **51**: 61-87
50. Sakumi K, Sekiguchi M (1990) *Mutat Res* **236**: 161-172
51. Mauro DJ, De Riel JK, Tallarida RJ, Sirover MA (1993) *Mol Pharmacol* **43**: 854-857
52. Zastawny TH, Deutsch PW, Dizdaroglu M (1995) *FEBS Lett* **364**: 255-258
53. Dizdaroglu M (1992) *Mutat Res* **275**: 331-342
54. Akman SA, Doroshov JH, Dizdaroglu M (1990) *Arch Biochem Biophys* **282**: 202-205
55. Kasprzak KS, Diwan BA, Rice JM, Misra M, Olinski R, Dizdaroglu M (1992) *Chem Res Toxicol* **5**: 809-815
56. Kasprzak KS, Zastawny TH, North SL, Riggs CW, Diwan BA, Rice JM, Dizdaroglu M (1994) *Chem Res Toxicol* **7**: 329-335
57. Toyokuni S, Mori T, Dizdaroglu M (1994) *Int J Cancer* **57**: 123-128
58. Karran P, Lindahl T (1978) *J Biol Chem* **253**: 5877-5879
59. Harosh I, Sperling J (1988) *J Biol Chem* **263**: 3328-3334
60. Karran P, Lindahl T (1980) *Biochemistry* **19**: 6005-6011
61. Dianov G, Lindahl T (1991) *Nucleic Acid Res* **19**: 3829-3833
62. Saporito SM, Laval J (1994) *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 5873-5877
63. Radman M (1976) *J Biol Chem* **251**: 1438-1445
64. Demple B, Linn S (1980) *Nature (Lond)* **287**: 203-208
65. Boiteux S, Pierre J, Laval J (1985) *Biochimie* **67**: 371-376
66. Asahara H, Wistort PM, Bank JF, Bakerian RH, Cunningham RP (1989) *Biochemistry* **28**: 4444-4449
67. Cunningham RP (1989) *Biochemistry* **28**: 4450-4455
68. Kuo WF, McRee DC, Fisher CL, O'Handley SF, Cunningham RP, Tainer JA (1992) *Ciencia* **258**: 434-440
69. Fu W, O'Handley SF, Cunningham RP, Johnson MK (1992) *J Biol Chem* **267**: 16135-16137
70. Katcher HL, Wallace SS (1983) *Biochemistry* **22**: 4071-4081
71. Doetsch PW, Helland DE, Haseltine WA (1986) *Biochemistry* **25**: 2212-2220
72. Helland DE, Doetsch PW, Haseltine WA (1986) *Mol Cell Biol* **6**: 1983-1990
73. Kow YW, Wallance SS, Van Houten B (1990) *Mutat Res* **235**: 147-156
74. Kow YW, Wallance SS (1987) *Biochemistry* **26**: 8200-8206
75. Kim J, Linn S (1988) *Nucleic Acids Res* **16**: 1135-1141
76. Breimer LH, Lindahl T (1985) *Biochemistry* **24**: 4018-4022
77. Breimer LH, Lindahl T (1985) *Mutation Res* **150**: 85-89
78. Dizdaroglu M, Laval J, Boiteux S (1993) *Biochemistry* **32**: 12105-12111
79. Lindahl T (1979) *Prog Acid Res Mol Biol* **22**: 135-192
80. Richardson CC, Lehman IR, Kornberg A (1964) *J Biol Chem* **239**: 242-250
81. Rogers SG, Weiss B (1980) *Methods Enzymol* **65**: 201-211
82. Demple B, Johnson A, Fung D (1986) *Proc Natl Acad Sci USA* **83**: 7731-7735
83. Weiss B (1976) *J Biol Chem* **251**: 1896-1901
84. Weiss B, Rogers SG, Taylor AF (1978) W: Hanawalt, EC, Freidberg EC, Fox CF (red) DNA repair mechanisms, New York Academic Press, str 191-194
85. Cunningham RP, Saporito SM, Spilzer SG, Weiss B (1986) *J Bacter* **168**: 1120-1127
86. Ljungquist S (1977) *J Biol Chem* **252**: 2808-2814
87. Gajewski E, Aruoma OI, Dizdaroglu M, Halliwell B (1991) *Biochemistry* **30**: 2444-2448
88. Altman SA, Zastawny TH, Randers L, Zhanglin L, Lumpkin JA, Remacle J, Dizdaroglu M, Rao G (1994) *Mutation Res* **306**: 35-44
89. Chan E, Weiss B (1987) *Proc Natl Acad Sci USA* **84**: 3189-3193
90. Levin JD, Johnson AW, Demple B (1988) *J Biol Chem* **263**: 8066-8071
91. Levin JD, Shapiro R, Demple B (1991) *J Biol Chem* **266**: 22893-22898
92. Ramator D, Popoff SC, Demple B (1991) *Mol Microbiol* **5**: 149-155
93. Melamede RJ, Hatahet Z, Kow YW, Ide H, Wallace SS (1994) *Biochemistry* **33**: 1255-1264
94. Cunningham RP, Weiss B (1985) *Proc Natl Acad Sci USA* **82**: 474-478
95. Ide H, Kow YW, Wallance SS (1985) *Nucleic Acids Res* **13**: 8035-8052
96. Laspia MF, Wallace SS (1988) *J Bacteriol* **170**: 3359-3366
97. Lindahl T, Sedgwick B, Sekiguchi M, Nakabeppu Y (1988) *Annu Rev Biochem* **57**: 133-157
98. Wallace SS (1988) *Environ Mol Mutagen* **12**: 431-477
99. Sancar GB, Smith FW (1988) *Gene* **64**: 87-96
100. Dizdaroglu M, Zastawny TH, Carmical RJ, Lloyd S (1995) *Mutat Res w druku*
101. Steenken S (1989) *Chem Reviews* **89**: 503-520
102. Doetsch PW, Zastawny TH, Martin AM, Dizdaroglu M (1995) *Biochemistry* **34**: 737-742
103. Mori T, Dizdaroglu M (1994) *Radiat Res* **140**: 85-90
104. Olinski R, Zastawny T, Budzbon J, Skokowski J, Zegarski W, Dizdaroglu M (1992) *FEBS Lett* **193**: 193-198
105. Jaruga P, Zastawny TH, Skokowski J, Dizdaroglu M, Olinski R (1994) *FEBS Letters* **341**: 59-64
106. Sancar A, Sancar GB (1988) *Annu Rev Biochem* **57**: 29-67
107. Oh EY, Grossman L (1986) *Nucleic Acids Res* **14**: 8557-8571
108. Grossman L, Caron PR, Oh EY (1986) *Basic Life Sci* **38**: 287-294
109. Janion C (1992) *Post Biochem* **38**: 55-58
110. Nabben FJ, Lafleur MV, Sikkers JC, Loman AC, Retel J, Loman H (1984) *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med* **45**: 379-388
111. Saporito SM, Gedenk M, Cunningham RP (1989) *J Bacteriol* **171**: 2542-2546
112. Czeczot H, Tudek B, Lambert B, Laval J, Boiteux S (1991) *J Bacteriol* **173**: 3419-3224
113. Bessho T, Tano K, Kasai H, Ohtsuka E, Nishimura S (1993) *J Biol Chem* **268**: 19416-19421
114. Klein JC, Bleeker MJ, Saris CP, Roelen HCPF, Bruggehe HF, van den Elst H, van der

- Marel GA, van Boom JH, Westra JG, Krick E, Berns AM (1992) *Nucleic Acids Res* 20: 4437-4443
115. Wood ML, Esteve A, Morningstar ML, Kuziemko GM, Essigman JM (1992) *Nucleic Acids Res* 20: 6023-6032
116. Olinski R, Zastawny TH, Foksinski M, Bare-

- cki A, Dizdaroglu M (1995) *Free Rad Biol Med* 18: 807-813
117. Breimer LH (1988) *Br Cancer* 57: 6-18
118. Grollman AP, Johnson F, Tchou J, Eisenberg M (1994) *Ann NY Acad Sci* 726: 208-213

# Budowa i funkcja antygenów zgodności tkankowej (MHC) klasy I

## Structure and function of the MHC class I molecules

BOGDAN FALKIEWICZ<sup>1</sup>,  
BOGDAN LIBEREK<sup>2</sup>

### Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Klasa I antygenów MHC
- III. Ogólny schemat budowy cząsteczek MHC I
- IV. Budowa szczytliny wiążącej i mechanizm prezentacji peptydów
- V. Antygenowe peptydy prezentowane przez cząsteczkę MHC I
- VI. Rozpoznawanie kompleksu MHC-peptyd. Koreceptory CD4 i CD8
- VII. Uwagi końcowe

### Contents:

- I. Introduction
- II. Antigens of the MHC class I
- III. General scheme of the MHC I molecule structure
- IV. Structure of the binding groove and mechanism of peptides presentation
- V. Antigenic peptides bound by the MHC I molecules
- VI. Recognition of MHC-peptide complex. Coreceptors CD4 and CD8
- VII. Concluding remarks

**Wykaz stosowanych skrótów:** Arg — arginina; Asp — kwas asparaginowy;  $\beta$ 2m —  $\beta$ -2 mikroglobulina; CD — kompleks różnicowania; Cys — cysteina; H — antygeny MHC myszy; His — histydyna; HLA — antygeny ludzkich leukocytów; IL — interleukina; LFA — antygeny związane z czynnością limfocytów; limfocyt NK — naturalna komórka cytotoksyczna NK; limfocyt  $T\alpha\beta$  — limfocyt T posiadający receptor  $\alpha\beta$ -CD3; limfocyt  $T\gamma\delta$  — limfocyt T posiadający receptor  $\gamma\delta$ ; Lys — lizyna; MHC — główny kompleks zgodności tkankowej; Pn — n-ta reszta aminokwasowa w sekwencji prezentowanego peptydu; P $\Omega$  — ostatnia reszta aminokwasowa w sekwencji prezentowanego peptydu; TCR — receptor limfocyta  $T\alpha\beta$ ; Thr — treonina; Trp — tryptofan; Tyr — tyrozyna; VLA — antygeny bardzo późne;

### I. Wstęp

Specyficzna odpowiedź immunologiczna powstaje przeciwko potencjalnie patogennym w stosunku do gospodarza cząsteczkom, organizmom lub też własnym komórkom przekształconym nowotworowo. Aby odpowiedź taka mogła powstać, intruz musi zostać rozpoznany przez układ odpornościowy jako obcy, a więc przeznaczony do eliminacji. „Rozpoznawanie

molekularne” rozumiemy jako proces obejmujący selekcję i wiązanie substratu przez cząsteczkę receptora, ukierunkowany na możliwie sprecyzowany cel i skutki tego oddziaływania [1].

Receptory komórek układu odpornościowego nie są w stanie identyfikować antygenów oddzielonych od nich przez błonę komórkową. W toku ewolucji został więc wytworzony system przekazywania na powierzchnię komórki informacji o wewnątrzkomórkowej obecności nieproszonego gościa. Powstająca w następstwie odpowiedź immunologiczna winna być specyficzna w stosunku do czynnika wywołującego, a zatem sygnał docierający na zewnętrzną stronę błony komórkowej musi być dla niego charakterystyczny. Jest to możliwe dzięki temu, że w zasadzie każdy obcy organizm ma przynajmniej jedno białko o sekwencji różnej od białek gospodarza. Może być ono jednoznacznie reprezentowane przez krótką sekwencję peptydową, różną od peptydów podobnej długości, pochodzących z białek gospodarza. Peptydy takie są syntetyzowane, transportowane na powierzchnię komórki, a tam udostępniane receptorom komórek układu odpornościowego.

Zasadniczą rolę w prezentacji obcych oraz własnych antygenowych peptydów limfocytom  $T\alpha\beta$  odgrywają glikoproteiny MHC (Major Histocompatibility Com-

<sup>1</sup> Mgr chemii, lek. med., <sup>2</sup> prof. dr hab. inż. Zespół Chemii Aminokwasów i Peptydów, Wydział Chemii, Uniwersytet Gdański, ul. Sobieskiego 18, 80-952 Gdańsk.

plex). Znajomość budowy, funkcji i metabolizmu cząsteczek MHC ma pierwszoplanowe znaczenie przy próbach ukierunkowanej ingerencji terapeutycznej, której ramieniem efektorowym miałyby być komórki układu odpornościowego i/lub ich liczne produkty. Coraz bardziej realna wydaje się też możliwość wpływania na inicjację i przebieg procesów chorobowych związanych z występowaniem określonych białek MHC [2, 3]. Przedmiotem artykułu jest korelacja pomiędzy elementami strukturalnymi cząsteczek MHC klasy I a ich funkcją fizjologiczną.

## II. Klasa I antygenów MHC

Produkty głównego kompleksu zgodności tkankowej klasy I, podobnie jak i klasy II, są glikoproteinami powierzchniowymi błon komórkowych. Białka obu klas zaangażowane są w wiązanie, transport na zewnętrzną powierzchnię komórki i udostępnianie tam antygenowych peptydów limfocytom  $T\alpha\beta$ . Zwyczajowo białka MHC myszy nazywa się antygenami H, natomiast ludzkie oznaczane są jako HLA (*Human Leukocyte Antigens*).

W skład klasycznych białek MHC klasy I u człowieka wchodzi cząsteczki HLA-A, -B i -C. Antygeny te występują na powierzchni większości jądrzastych komórek i erytrocytów. Poziom ekspresji MHC I na poszczególnych rodzajach komórek jest znacznie zróżnicowany. Charakterystyczną cechą białek MHC I jest silny polimorfizm. Wynika on z istnienia każdego z genów MHC I w postaci do kilkudziesięciu alleli, a więc odmian zajmujących to samo miejsce (locus) w chromosomie. Pomiedzy allelami określonego genu MHC występują różnice sekwencji sięgające kilkunastu procent zawartości.

Kompleks MHC u człowieka zlokalizowany jest na krótkim ramieniu chromosomu 6. Ludzkie komórki heterozygotyczne posiadają produkty sześciu kodominujących alleli klasy I (HLA-A, B i C pochodzące od ojca i matki), odpowiednio po dwa białka HLA-A, -B i -C. Poszczególne cząsteczki MHC preferują prezentację peptydów o charakterystycznych elementach składowych, takich jak odpowiednia długość, obecność określonych reszt aminokwasowych w pewnych miejscach sekwencji peptydu itp. Zdolność pojedynczego osobnika do prezentacji antygenowych peptydów wspólnie z cząsteczkami klasy I jest więc sumą preferencji występujących u niego odmian cząsteczek HLA. Dodatkowo allele genów układu HLA występują w populacji ludzkiej z różną częstością. Ma to znaczenie przy próbach poszukiwania szczepionek opartych na peptydach prezentowanych przez cząsteczki MHC. Dobór sekwencji takiego peptydu powinien uwzględniać przydatność w immunizacji możliwie szerokiego kręgu ludzi. Można to osiągnąć poprzez wybór peptydu zdolnego do wiązania się z jak największą liczbą odmian cząsteczek MHC I, szczególnie z występującymi najczęściej w populacji. Zróżnicowanie zestawu

białek MHC klasy I pomiędzy osobnikami tego samego gatunku nadaje im charakter alloantygenów, tzn. antygenów rozpoznawanych jako obce przez osobniki tego samego gatunku różniące się genetycznie.

Funkcją molekularną antygenów MHC I jest prezentacja limfocytom  $T\alpha\beta$  peptydów pochodzących z białek syntetyzowanych we wnętrzu komórki. Z cząsteczkami MHC I wiążą się peptydy pochodzące z białek własnych komórki, białek egzogennych wnikających do cytosolu w wyniku fuzji z innymi komórkami, białek związanych z błonami podlegającymi obrotowi błonowemu, syntezowanych przez komórkę białek wirusowych lub białek produkowanych przez patogeny wewnątrzkomórkowe o lokalizacji cytoplazmatycznej, mitochondrialnej, jądrowej [4]. Takie cząsteczki białkowe są degradowane w cytosolu do fragmentów peptydowych przez endopeptydazy cytoplazmatyczne, zgrupowane w wielokatalitycznych kompleksach proteosomów. Większość powstałych peptydów ulega całkowitej hydrolizie, jednak część przechodzi przy pomocy specyficznych transporterów TAP (*Transporter associated with Antigen Processing*) do wnętrza retikulum endoplazmatycznego [5, 6]. Tam odpowiednie dla danej cząsteczki MHC I peptydy łączą się z łańcuchami ciężkimi cząsteczek MHC I i  $\beta$ 2-mikroglobuliną. Stabilizują one strukturę dupleksu MHC I- $\beta$ 2-m. Powstały trypleks jest transportowany na powierzchnię komórki [2, 4, 6-7]. Znane są nieliczne przykłady wiązania przez MHC I peptydów pochodzących z białek zewnątrzkomórkowych, które dostają się do wnętrza komórki na drodze fagocytozy [8]. Cząsteczki MHC klasy I zlokalizowane na powierzchni limfocytów T pełnią też funkcję receptora przekazującego sygnał do wnętrza komórki [9].

Peptydy połączone z MHC I rozpoznawane są wspólnie z cząsteczką MHC przez limfocyty  $T\alpha\beta$  posiadające na swojej powierzchni koreceptor CD8 (limfocyty T CD8+). CD8 jest receptorowym białkiem błonowym, należącym do nadrodziny białek immunoglobulinopodobnych. W procesie rozpoznawania kompleksu MHC I-peptyd przez TCR, CD8 wiąże się z cząsteczką MHC I. Limfocyty T CD8+ stanowią głównie grupę komórek cytotoksycznych i supresorowych. W trakcie rozwoju układu odpornościowego eliminowane są komórki T rozpoznające peptydy pochodzące z własnych białek organizmu, a w populacji dojrzałych limfocytów T pozostają tylko komórki rozpoznające peptydy obce. Po rozpoznaniu kompleksu obcego peptydu i własnej cząsteczki MHC I limfocyt T ulega aktywacji. Jest to złożony proces odpowiedzi komórkowej, na który składają się m.in. wejście w fazę  $G_1$  cyklu komórkowego i ekspresja receptorów dla czynników wzrostowych. Pod wpływem tych czynników aktywowany limfocyt ulega różnicowaniu w kierunku określonej subpopulacji funkcjonalnej i rozpoczyna proliferację. Jeżeli końcowym efektem tych przemian będzie powstanie klonu limfocytów cytotoksycznych, doprowadzają one do

zniszczenia komórki prezentującej antygenowy peptyd. Peptydy prezentowane przez HLA-B i -C rozpoznawane są także przez limfocyty NK [10].

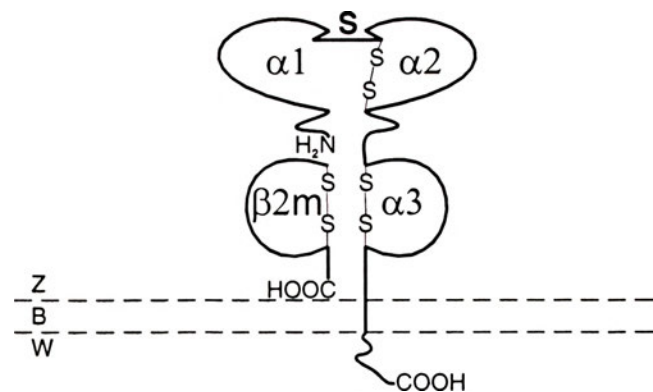
Niekodowane przez kompleks MHC cząsteczki CD1b (nieklasyczne cząsteczki MHC klasy Ib), składające się z łańcucha ciężkiego znacznie zbliżonego budową do obecnego w MHC I oraz  $\beta 2m$ , prezentują limfocytom  $T\alpha\beta$  i  $T\gamma\delta$  antygeny peptydowe i lipidowe [11-15]. Podobne białka H2-M3 wiążą peptydy z N-formylovanym końcem aminowym [16].

### III. Ogólny schemat budowy cząsteczek MHC I

Cząsteczki MHC I są powierzchniowymi heterodimerami białkowymi. Składają się z dwóch łańcuchów. Ciężki albo  $\alpha$  ma masę około 40-45 kDa i jest kodowany w obrębie regionu MHC kodującego klasę I. Łańcuch lekki, czyli  $\beta$ -2 mikroglobulina ( $\beta 2m$ ), ma masę 12 kDa i zawiera 96 reszt aminokwasowych. Jego gen u człowieka występuje w postaci jednej kopii na chromosomie 15.

Łańcuch ciężki składa się z trzech części. Fragment C-końcowy o długości 30-40 reszt aminokwasowych stanowi część wewnątrzkomórkową. Jest on odcinkiem hydrofilowym, około połowy tworzących go reszt aminokwasowych ma polarne łańcuchy boczne. Pozostałe części to wewnątrz błonowy region hydrofobowy, utworzony przez około 20-25 reszt aminokwasowych i N-końcowa część zewnątrzkomórkowa, stanowiąca pozostałe 80% długości łańcucha. Część zewnątrz błonowa tworzy trzy domeny, po około 90 reszt aminokwasowych każda, kolejno zwane  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$ . Wewnątrz domen  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$  i  $\beta 2m$  zawarte są pętle utworzone przez około 60 reszt aminokwasowych zamkniętych wiązaniami disulfidowymi.

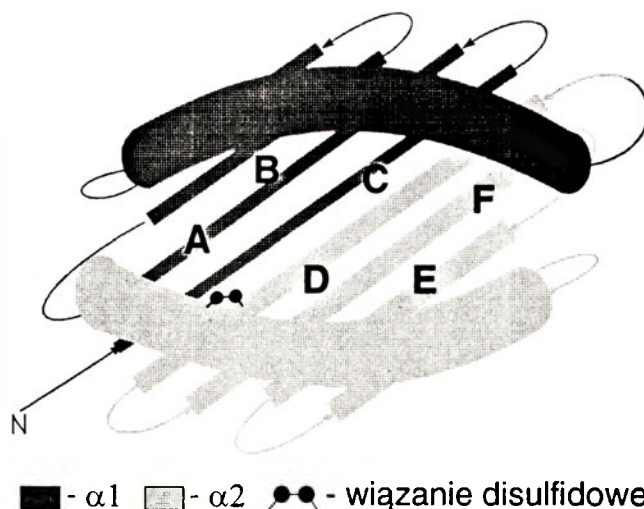
Domeny tworzą dwie pary strukturalnie podobnych jednostek. Pierwsza para jest położona blisko ponad błoną komórkową. Składa się z  $\beta 2m$  i domeny  $\alpha 3$  łańcucha ciężkiego, które cechują się niewielkim polimorfizmem i wykazują znaczną homologię sekwencji



Ryc. 1 Budowa cząsteczki MHC klasy I.  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$ -domeny łańcucha ciężkiego;  $\beta 2m$ — $\beta$ -2 mikroglobulina; S-S — mostki disulfidowe; Z — część zewnątrzkomórkowa; B — błona komórkowa; W — wewnątrz komórki; S — szczelina wiążąca peptydy.

aminokwasowej. Każda z nich przypomina stałą domenę części stałej łańcucha przeciwciał [17]. Obecność  $\beta 2m$  jest zwykle warunkiem ekspresji cząsteczek MHC I na powierzchni komórek, natomiast po proteolitycznym odcięciu domeny  $\alpha 3$  cząsteczka HLA-Aw68 zachowuje zdolność do prezentacji peptydu [18].

Drugą parę stanowią domeny  $\alpha 1$  i  $\alpha 2$ . Obie odznaczają się znacznym polimorfizmem i mają podobną strukturę przestrzenną, stanowiąc niemalże lustrzane odbicia. Każda składa się z czterech biegnących antyrównolegle odcinków  $\beta$ , ograniczonych z jednej strony przez długi  $\alpha$ -heliks (pasmami lub odcinkami  $\beta$  będziemy w skrócie nazywać odcinki łańcucha polipeptydowego tworzące strukturę  $\beta$ ). Dzięki temu domeny te formują wspólnie pseudosymetryczną powierzchnię szczytową cząsteczki, która składa się z dna (podłogi) utworzonego przez 8 antyrównoległych pasm  $\beta$ , otoczonego przez dwa długie regiony  $\alpha$ -helikalne. Pasma  $\beta$  łączą się poprzez zawierające różną liczbę reszt aminokwasowych pętle zwrotne. Pomiedzy obydwoma regionami  $\alpha$ -helikalnymi powstaje w szczytowej części cząsteczki MHC I głęboka szczelina (nazywana też zamiennie wnęką lub rowkiem) o długości około 25 Å i szerokości około 10 Å, pokazana w sposób uproszczony na rycinie 2. Ściany szczeliny formowane są przez łańcuchy boczne reszt aminokwasowych obu heliksów, natomiast dno przez łańcuchy boczne reszt aminokwasowych części centralnych pasm  $\beta$  domen  $\alpha 1$  i  $\alpha 2$ . Szczelina cząsteczek MHC I jest zamknięta na obu końcach przez skrajne części heliksów. Obraz taki otrzymujemy na podstawie struktur rentgenowskich po „usunięciu” prezentowanego peptydu, który w zwykłych warunkach zajmuje szczelinę. Szczeliny pochodzące z cząsteczek MHC I izolowanych z materiału biologicznego w badaniach rentgenograficznych wykazują obecność niejednorodnej, pod względem gęstości elektronicznej, zawartości, będącej mieszaniną pep-



Ryc. 2 Schemat szczeliny wiążącej peptydy cząsteczki MHC I w nieobecności peptydu. Zaznaczono wkład domen  $\alpha 1$  i  $\alpha 2$  w budowę regionu wiążącego oraz wiązanie disulfidowe w domenie  $\alpha 2$ . Przedstawiono także w sposób uproszczony lokalizację kieszeni szczeliny wiążącej, odpowiednio A-F.

tydów prezentowanych limfocytom T CD8+ [19-21].

Część domen łańcucha ciężkiego białek MHC I jest miejscem glikozylacji. U myszy dochodzi do niej w pozycjach reszt aminokwasowych 86 ( $\alpha 1$ ) i 176 ( $\alpha 2$ ), natomiast w wypadku człowieka tylko 86 ( $\alpha 1$ ). W niektórych cząsteczkach mysich glikozylacja zachodzi także w pozycji 256 ( $\alpha 3$ ) [22].

Struktury cząsteczek MHC I analizowano w oparciu o metody krystalografii rentgenowskiej. Antygeny MHC krystalizowano po izolacji z naturalnych źródeł w postaci kompleksu z mieszaniną endogennych peptydów, które otrzymywano dzięki heterologicznej ekspresji w hodowli komórkowej lub też dokonywano rekrytalizacji ze zdenaturowanych podjednostek w połączeniu z określonym peptydem. W okresie ośmiu lat zdołano ustalić budowę produktów pięciu alleli klasy I [16, 23].

#### IV. Budowa szczeliny wiążącej i mechanizm prezentacji peptydów

Powierzchnia van der Waalsa szczeliny wiążącej jest w znacznym stopniu pofałdowana i rozbudowana. Tworzy ona szereg „kieszeni”, będących zagłębieniami o różnej wielkości i różnym charakterze chemicznym, zależnym od otaczających je aminokwasów cząsteczki MHC. Kieszeń stanowi strukturalnie i funkcjonalnie wydzieloną część struktury rowka o indywidualnym powinowactwie do części zawartości tego rowka (w wypadku białek MHC do fragmentu szkieletu lub łańcucha bocznego reszt aminokwasowych ulokowanego w szczelinie peptydu). Różnice aminokwasowe pomiędzy antygenami MHC mogą zmieniać wielkość, kształt i właściwości fizykochemiczne wnętrza kieszeni [16, 24-26]. Niektóre kieszenie są studniowato ukształtowane, jak wnęka lub wgniecenie, i specyficjnie pasują tylko do jednego łańcucha bocznego. Inne nie są tak dokładnie wykształcone i wówczas granica pomiędzy dwiema sąsiednimi kieszeniami jest niewyraźna. Odpowiednio dużych rozmiarów kieszeń może „przechowywać” więcej niż jeden łańcuch boczny peptydu. MHC I zawiera w szczelinie 6 kieszeni, nazwanych odpowiednio A-F, których lokalizację zaznaczono na rycinie 2 [27].

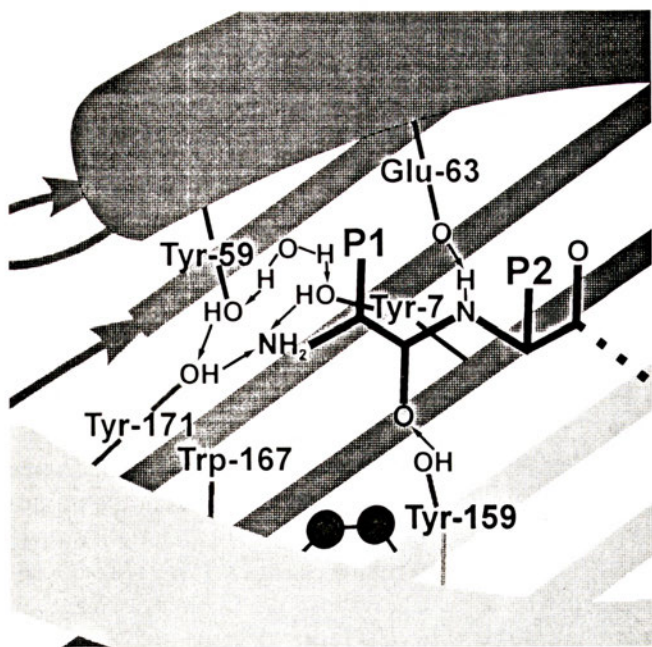
Pozycje aminokwasowe białek MHC I, wykazujące dużą zmienność pomiędzy poszczególnymi cząsteczkami, zlokalizowane są głównie wokół szczeliny wiążącej peptydy [21, 28]. W cząsteczce HLA-A2 spośród 17 pozycji o wysokim indeksie zmienności, 15 znajduje się w obszarze wiążącym peptyd. Jedna z dwu dalszych silnie polimorficznych pozycji lokuje się poza tym obszarem, ale łańcuch boczny występującej tam reszty aminokwasowej wystaje w kierunku heliksu i ma wpływ na budowę miejsca wiążącego. W obrębie szczeliny wiążącej w sekwencjach HLA i znaleziono 10 stałych reszt aminokwasowych [29], silnie zachowywanych także u myszy. Te niezmiennie reszty aminokwasowe są rozmieszczone głównie na obu końcach

wnęki, gdzie wiążą aminowy i karboksylowy koniec prezentowanego peptydu. Pomiedzy sekwencjami HLA nie ulega zmianie także co trzecia lub co czwarta reszta aminokwasowa w  $\alpha$ -heliksach domen  $\alpha 1$  i  $\alpha 2$ . Reszty te tworzą zachowywaną powierzchnię heliksów, skierowaną na zewnątrz od miejsca wiązania peptydu. Są one rozpoznawane bezpośrednio przez stałe części receptora TCR lub są konieczne do utrzymywania struktury MHC.

Peptyd we wnętrzu MHC I prezentowany jest w rozciągniętej konformacji. Podczas badania struktur kryształów HLA-B27, zawierających w szczelinie mieszaninę endogennych peptydów, stwierdzono wyraźne podobieństwo konformacji wszystkich wiązanych cząsteczek w ich częściach przykońcowych, przy mniejszym podobieństwie w centrum [30-32]. W czasie analizy dawało to efekt w postaci wyraźnie zaznaczonej gęstości elektronowej, odpowiadającej końcowym odcinkom łańcuchów głównych peptydów, a mniej wyraźnemu obrazowi ich części środkowych. Podobną konformację wykazywały peptydy związane z cząsteczkami HLA-A2 i HLA-Aw68 [19, 25, 32-33]. Oba końce peptydów są zagłębione i umocowane w szczelinie, natomiast część środkowa jest wiązana słabiej [19, 34]. Dzięki temu peptydy, o długości większej niż zwykle prezentowana przez dany antygen MHC, mogą się w pewnych warunkach wiązać z cząsteczką MHC I [35-38]. Ich końce znajdują się wówczas w ograniczających kieszeniach, natomiast środkowa część wybrzusza się ponad szczelinę [19, 27, 30, 35, 39]; niekiedy koniec karboksylowy może wystawać na zewnątrz szczeliny [35, 36]. Łańcuchy boczne peptydów prezentowanych przez tę samą cząsteczkę MHC I kierują się w różne strony. Związanie peptydu może w pewnym stopniu zmieniać strukturę cząsteczki MHC I — np. obserwowano powstawanie różnic sterycznych w budowie białka MHC w zależności od sekwencji wiążącego peptydu [19, 27, 32, 40].

W wypadku obu klas MHC możemy wyróżnić dwa rodzaje oddziaływań wiążących antygenowe peptydy. Pierwszy jest niezależny od sekwencji oligopeptydu i zawiera wiązania wodorowe pomiędzy niezmiennymi resztami aminokwasowymi cząsteczek MHC a stałymi elementami łańcucha peptydowego. Drugi stanowią oddziaływania pomiędzy polimorficznymi aminokwasami w kieszeniach szczeliny wiążącej cząsteczek MHC a łańcuchami bocznymi reszt aminokwasowych specyficznych dla prezentowanego peptydu.

W cząsteczkach MHC I oddziaływania pierwszej grupy angażują atomy szkieletu prezentowanego peptydu i jego końcowe grupy funkcyjne, lokujące się odpowiednio w kieszeniach A i F na końcach szczeliny wiążącej [16]. Związanie obu końców peptydu zapewnia stabilność jego konformacji, ale zwykle ogranicza maksymalną długość. Zachowywane oddziaływania w końcowych kieszeniach mają duży wkład w całkowitą energię wiązania peptydu, stanowiąc prawdopodobnie główny czynnik niezwyklej trwałości po-



■ -  $\alpha 1$  □ -  $\alpha 2$  → - wiązanie wodorowe

Ryc. 3 Schemat wiązania N-końca peptydu w kieszeni A. Zaznaczono wiązania wodorowe występujące w większości wykrywalnych kompleksów MHC I — peptyd oraz łańcuch boczny Trp-167 dodatkowo blokujący wyjście ze szczeliny wiążącej.

wstającego połączenia [34, 41].

Kieszeń A i F wiąże zawsze aminowy (kieszeń A, reszta P1) i karboksylowy (kieszeń F, reszta P $\Omega$ ) końce peptydu, umocowane przez rozległą sieć wiązań wodorowych. Dzięki temu ustalona jest polarność peptydów prezentowanych przez wszystkie cząsteczki klasy I [31]. Na wewnętrznych powierzchniach obu kieszeni znajduje się po kilka polarnych reszt aminokwasowych. Są one ustawione tak, że mogą oddziaływać z atomami szkieletu wiązanego peptydu, a więc elementem wspólnym dla wszystkich antygenowych peptydów prezentowanych przez MHC I.

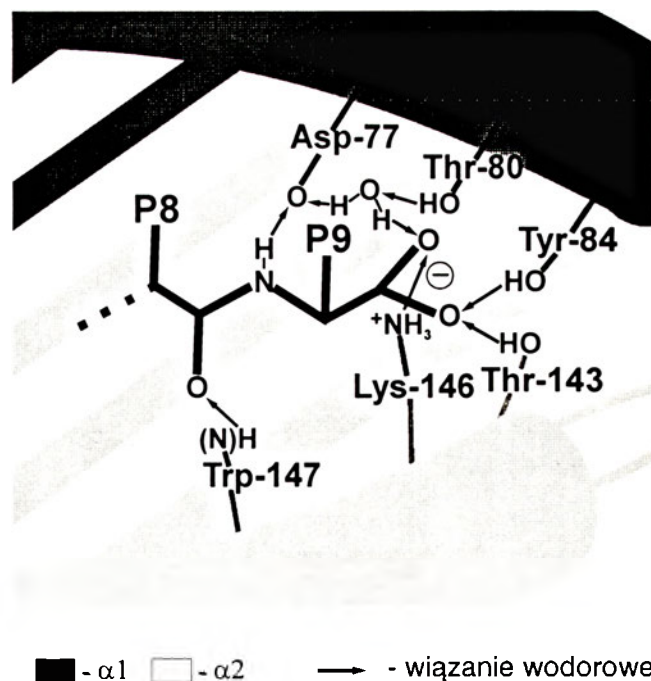
Energia wiązania N-końca peptydu w kieszeni A zależy w dużej mierze od obecności w niej trzech silnie zachowywanych reszt Tyr w pozycjach 7, 159 i 171 (Ryc. 3). Grupy hydroksylowe ich łańcuchów bocznych tworzą wiązania wodorowe z grupą aminową i tlenem karbonylowym reszty P1. Łańcuch boczny P1 wystaje na zewnątrz szczeliny. Pozwala to na występowanie w tej pozycji różnych reszt, pod warunkiem, że nie są zaburzone właściwości elektrostatyczne grupy  $\alpha$ -aminowej. Wzmocnieniem wiązania końca aminowego peptydu są wiązania wodorowe, powstające pomiędzy atomami reszt P2 i P3 jego szkieletu, a położonymi w pobliżu słabiej zachowywanymi resztami Glu-63, Lys-66 i Asn-70. Silnie zachowywane reszty Tyr-159, Trp-167 i Tyr-171 tworzą ścianę zamykającą ten koniec szczeliny wiążącej.

W większości białek MHC I (z wyjątkiem HLA-B27) dolna część kieszeni F (wiążącej C-końcowy fragment łańcucha głównego peptydu, (Ryc. 4) ma charakter hydrofobowy. Natomiast wejście do tej kieszeni (jej

część górna) jest hydrofilowe. Grupa karboksylowa i wodór amidowy reszty P $\Omega$  oraz atom tlenu karbonylowego przedostatniej reszty peptydu tworzą w okolicy wejścia do kieszeni wiązania wodorowe z łańcuchami bocznymi silnie zachowywanych reszt Tyr-84, Thr-143, Lys-146 (mostek solny), Trp-147 i z umiarkowanie zachowywaną resztą Asp-77. Przeciwnie niż w wypadku P1, łańcuch boczny reszty P $\Omega$  kieruje się w stronę dna szczeliny wiążącej. Tak więc rozmiar i właściwości chemiczne kieszeni F mogą determinować C-końcową resztę peptydu. Reszty Tyr-84 i Thr-143 zamykają ten koniec szczeliny wiążącej.

Na uwagę zasługuje kieszeń B cząsteczki HLA-B27, która zawiera zawsze łańcuch boczny reszty Arg występującej w pozycji P2 prezentowanych peptydów [30, 42]. Trzy z czterech polimorficznych reszt aminokwasowych MHC, znajdujących się w dnie tej kieszeni (His-9, Thr-24 i Glu-45) oraz związana w niej cząsteczka wody tworzą planarną sieć wiązań wodorowych z grupą guanidynową argininy [26, 31]. Obecna w pozycji 67 cysteina kieruje swoją grupę sulfhydrylową prawie bezpośrednio ponad centralny atom węgla grupy guanidynowej argininy. Wykazano, że ta nie tworząca wiązania disulfidowego reszta cysteiny jest modyfikowana kowalencyjnie w zeszywniającym zapaleniu stawów kręgosłupa, chorobie skorelowanej dodatkowo z występowaniem HLA-B27 [43]. Być może modyfikacja ta lub inne specyficzne cechy budowy HLA-B27 prowadzą do rozwoju procesu autoimmunologicznego [44].

Mysie cząsteczki H-2K<sup>b</sup> i H-2D<sup>b</sup> wykazują znaczne podobieństwo do ludzkich białek HLA [39, 45-46]. Poszczególne domeny są w 70-71% identyczne w odniesieniu do sekwencji aminokwasowej HLA-A2



■ -  $\alpha 1$  □ -  $\alpha 2$  → - wiązanie wodorowe

Ryc. 4 Schemat wiązania C-końca peptydu w kieszeni F. Zaznaczono wiązania wodorowe występujące w większości wykrywalnych kompleksów MHC I — peptyd.

i w 84,5% pomiędzy obiema mysimi cząsteczkami. W dnie centralnej części wnęki D<sup>b</sup> trzy reszty aminokwasowe (Trp-73, Tyr-156, Trp-147), których łańcuchy boczne kierują się ku sobie przecinając szczelinę, powodują powstanie wydatnego garbu. Obecność hydrofobowego grzbietu wymusza kompensacyjne wybrzuszenie łańcucha głównego prezentowanych peptydów. Na podstawie sekwencji cząsteczek MHC można przewidywać, że taki garb występuje w ok. 25% mysich cząsteczek MHC I, nie ma go natomiast w żadnej ze znanych cząsteczek ludzkich [46].

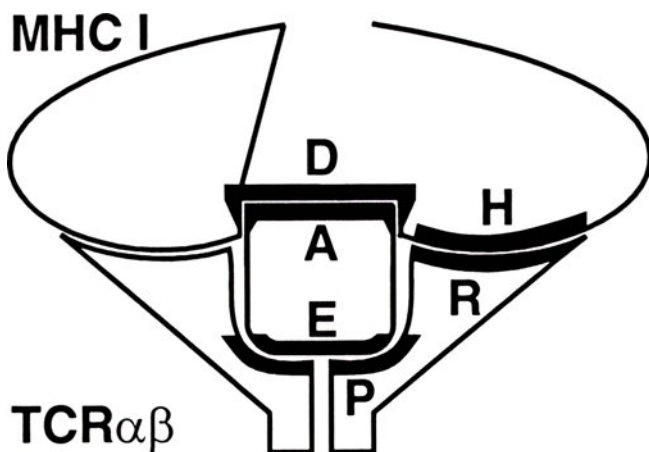
Określenie wpływu reszt aminokwasowych otaczających kieszenie na właściwości poszczególnych kieszeni pozwala przewidzieć zdolności cząsteczek MHC do wiązania peptydu na podstawie samej sekwencji białka.

W prezentowanych przez cząsteczki MHC I oligopeptydach wyróżniamy odpowiednio (Ryc. 5): część peptydu wiążaną przez TCR — nazwaną epitopem oraz agreto — część wiążącą się z cząsteczką MHC. Agretopowi odpowiada desetop — część cząsteczki MHC wiążąca peptyd oraz paratop — część receptora TCR kontaktująca się z peptydem. Część białka MHC rozpoznawaną przez TCR nazywamy histotopem, a odpowiednią powierzchnię TCR wiążącą MHC — restitopem. Poszczególne reszty aminokwasowe prezentowanych peptydów mogą równocześnie wchodzić w skład epitopu i agretopu [22, 47].

## V. Antygenowe peptydy prezentowane przez cząsteczki MHC I

Poszczególne komórki dysponują kompletem tylko kilku różnych cząsteczek MHC I. Równocześnie układ odpornościowy musi sprostać zadaniu prezentacji i rozpoznawania ogromnej liczby antygenów ( $10^5$  cząsteczek HLA-A2 na powierzchni limfocyta wiąże równocześnie  $10^3$  różnych peptydów [48]).

Peptydy zawarte w szczelinach cząsteczek MHC I od 1990 roku poddawano izolacji i analizie sekwencyjnej [49]. Obecnie znamy ponad cztery tysiące ligandów peptydowych wiążących się z antygenami



Ryc. 5 Nomenklatura miejsc oddziaływania pomiędzy cząsteczką MHC I, prezentowanym peptydem i receptorem limfocyta T $\alpha\beta$  (TCR $\alpha\beta$ ). E — epitop, A — agretop, D — desetop, H — histotop, R — restitop.

MHC, których sekwencje dostępne są m.in. poprzez Internet w banku MHCPEP [50].

Z cząsteczek MHC I izolowano oligopeptydy złożone w większości z 9 aminokwasów (rzadziej 8, w pojedynczych przykładach 7, 10-12). Restrykcja długości wynika z faktu, że rowek w cząsteczkach klasy I MHC jest zamknięty na obu końcach, co ogranicza rozmiary wiązanych antygenów. Sekwencje peptydów prezentowanych przez poszczególne cząsteczki MHC mają identyczne lub podobne elementy składowe (reszty aminokwasowe nazwane „kotwiczącymi”), znajdujące się w określonych pozycjach peptydów izolowanych z połączenia z daną cząsteczką MHC I. Każda z cząsteczek MHC I narzuca więc pewne reguły, nazwane motywem sekwencyjnym, dotyczące składu aminokwasowego i długości peptydów zdolnych do trwałego ulokowania się w szczelinie cząsteczki. Wybór sekwencji peptydu ograniczony jest do kilku kotwiczących reszt aminokwasowych, które zajmują różne miejsca w znanych motywach sekwencyjnych [5, 49]. Najczęściej są to dwie lub trzy reszty, zwykle pozycja P2 i C-końcowa albo P5 i C-końcowa. Jedna z nich, jako kieszeń dla danej cząsteczki główna, o największym wkładzie do energii wiązania, ma znaczenie decydujące. Ponadto preferowane są peptydy „pasujące” do jeszcze 1 lub 2 mniej ważnych kieszeni. Takie ograniczone wykorzystanie kieszeni w wyborze peptydu pozwala na wiązanie około  $10^4$  różnych peptydów przez dany antygen MHC I [26].

Restrykcja narzucana przez kieszenie może być ścisła lub słabiej sprecyzowana. W większości cząsteczek ograniczenia w doborze aminokwasów w poszczególnych pozycjach sprowadzają się do konieczności zachowywania przez ich łańcuchy boczne podobieństwa sterycznego lub chemicznego (np. niepolarności, ładunku, wielkości). Dla przykładu, peptydy wiązane przez HLA-B27 niezmiennie posiadają argininę w pozycji P2, ponadto często resztę aminokwasową z aromatycznym łańcuchem bocznym w pozycji P3, a argininę lub lizynę jako koniec karboksylowy (P $\Omega$ ). Jest to wynik występowania w HLA-B27 unikatowej kieszeni B, silnie preferującej wiązanie Arg P2 [26, 30-31, 42, 52]. Z HLA-A2 wiążą się peptydy posiadające resztę aminokwasową z dużym, alifatycznym łańcuchem bocznym w pozycji 2 (P2), oraz z mniejszym hydrofobowym łańcuchem bocznym na końcu karboksylowym (P $\Omega$ ). Odpowiada to dwóm najwydatniejszym kieszeniom szczeliny wiążącej HLA-A2. Pozostałe pozycje charakteryzują się dużą dowolnością, jednak w pewnych wypadkach widać określone preferencje w doborze aminokwasów na miejscach niekotwiczących [23].

## VI. Rozpoznawanie kompleksu MHC-peptyd. Koreceptory CD4 i CD8

Niepobudzony limfocyt T $\alpha\beta$  wymaga do aktywacji przynajmniej dwóch rodzajów sygnału. Jeden z nich

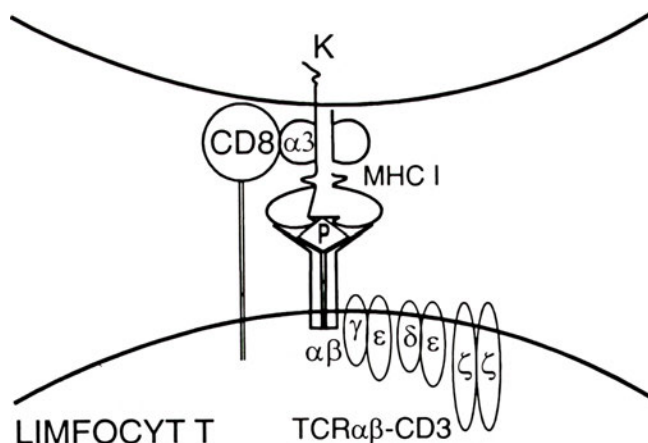


powstaje dzięki rozpoznaniu peptydowego epitopu wraz z cząsteczką MHC za pomocą specyficznego dla danego peptydu TCR [53]. Determinuje on wybór limfocyta podlegającego pobudzeniu. Drugi sygnał nie jest antygenowo specyficzny i biegnie inną niż TCR drogą. Nazywamy go sygnałem kostymulującym, gdyż nie indukuje on samoistnie pozytywnej odpowiedzi limfocyta. Jego źródłem mogą być m.in. cząsteczki koreceptorów i cytokiny [53-55]. Limfocyt wiążący antygen, a nie pobudzony dodatkowo sygnałem kostymulującym przechodzi w stan czynnościowej inaktywacji (anergii) lub ginie. Sygnał dodatkowy reguluje więc kierunek odpowiedzi. Konieczność wzmocnienia sygnału aktywującego limfocyty wynika także z potrzeby zwiększenia czułości układu odpornościowego na zwykle małe dawki antygeny. Wiadomo, że tylko kilkaset identycznych kompleksów peptyd-MHC jest równocześnie prezentowanych na powierzchni komórki prezentującej [56]. Ponadto półokres dysocjacji kompleksu TCR-MHC jest krótki (ok. 27 s.) [57]. Wynika z tego, że jedynie kilka cząsteczek TCR może związać kompleksy MHC I-peptyd i aby mogła zaistnieć odpowiedź komórki na rozpoznawanie, ich sygnał powinien być zwielokrotniony [58].

Niezależnie od różnic w ukierunkowaniu wystających na zewnątrz szczyłiny łańcuchów bocznych peptydu, około 300-500 Å<sup>2</sup> jego powierzchni jest dostępne dla receptora limfocyta T [23]. Mniej polimorficzne obszary regionu zmiennego TCR łączą się ze stałymi fragmentami regionu wiążącego MHC, podczas gdy silnie polimorficzne obszary regionu zmiennego TCR rozpoznają epitop peptydowy. Dzięki stereotypowemu wiązaniu obszarów mniej polimorficznych, wnoszącemu znaczny wkład w oddziaływanie białko-białko, do zapewnienia właściwej specyficzności rozpoznania potrzebny jest niewielki udział energetyczny oddziaływania TCR-rozpoznawany peptyd [4].

Identyfikacja obcego antygeny i własnej cząsteczki MHC odbywa się równocześnie (Ryc. 6). Gdy TCR wiąże się z fragmentem cząsteczki MHC I lub II prezentującej obcy antygen, cząsteczka (koreceptor) odpowiednio CD8 lub CD4, obecna na powierzchni limfocyta T $\alpha\beta$ , wiąże monomorficzny fragment tej samej cząsteczki MHC. CD8 wiąże domenę  $\alpha 3$  łańcucha ciężkiego MHC I [59-60]. Oprócz korekcji poprzez CD8 lub CD4 do prawidłowej aktywacji limfocyta T $\alpha\beta$  potrzeba jeszcze innych kostymulujących oddziaływań. Są to m.in. oddziaływania z cząsteczkami powierzchniowymi komórki prezentującej, poprzez koreceptory CD2, CD5, CD26, CD28, CD43, CD45, VLA-4, VLA-5, LFA-1 [53, 61]. Ponadto różnicowanie i proliferacja limfocytów T wymaga ich interakcji z cytokinami, takimi jak IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-9, IL-12, IL-15 [22, 59, 61].

Cząsteczki CD4 i CD8 pełnią funkcję antygenów różnicowania limfocytów T $\alpha\beta$ . W zależności od tego, czy na powierzchni dojrzałego limfocyta T $\alpha\beta$  występuje koreceptor CD4 czy CD8, mówimy o grupie



Ryc. 6 Schemat rozpoznawania cząsteczki MHC prezentującej antygenowy peptyd przez limfocyt T. K — komórka prezentująca cząsteczkę MHC wiążącą peptyd;  $\alpha 3$  — domena  $\alpha 3$ ; P — antygen peptydowy; CD8 — koreceptor CD8; TCR — receptor limfocyta T $\alpha\beta$ ;  $\alpha, \beta$  — łańcuchy receptora limfocyta T;  $\gamma, \delta, \zeta, \epsilon, \xi$  — poszczególne łańcuchy CD3.

limfocytów T CD4+ lub T CD8+. Nie jest to tylko różnica morfologiczna, ale przede wszystkim czynnościowa. Obecność jednego z tych koreceptorów determinuje klasę MHC, której restrykcji dana subpopulacja podlega. Ponieważ cząsteczka CD8 rozpoznaje cząsteczkę MHC I, limfocyty T CD8+ rozpoznają peptydy prezentowane wspólnie z MHC I. Funkcjonalnie grupę tę, jak wspomniano, stanowią głównie limfocyty cytotoksyczne i supresorowe.

## VII. Uwagi końcowe

Badania struktury i funkcji cząsteczek MHC znajdują się w centrum zainteresowania immunologii. Stąd duża liczba publikacji sumujących, ukazujących się na ten temat w piśmiennictwie światowym [tylko w ciągu ostatnich 3 lat m.in. 4-5, 16, 23, 44, 49, 51, 62-64]. Najszersze polskie opracowanie zawarte jest w podręczniku pod red. M. Jakóbiaśa [61].

Mimo znacznego postępu pozostaje jeszcze do wyjaśnienia wiele szczegółów o istotnym znaczeniu. Dokładne sprecyzowanie mechanizmów wyboru i prezentacji ligandów przez cząsteczki MHC może otworzyć drogę do wykorzystania peptydów o odpowiednich sekwencjach w profilaktyce i terapii. Wyjaśnienie przebiegu procesów „obróbki” (ang. „processing”) natywnych antygenów jest drogą do opracowania skutecznych postaci preparatów peptydowych. Wreszcie metodą terapeutyczną stać się może także modyfikacja (chemiczna lub genetyczna) cząsteczek MHC, w celu blokowania lub zmiany ich funkcji.

### Podziękowanie

Przegląd zrealizowany został w związku z projektem badawczym KBN nr 208019101.

Artykuł otrzymano 19 czerwca 1995 r.  
Zaakceptowano do druku 13 listopada 1995 r.

Ze względu na ograniczenie objętości pracy wymieniono tylko wybrane pozycje piśmiennictwa.

1. Lehn J-M (1973) *Struct Bonding* (Berlin) **16**: 1
2. McMichael A (1993) *Science* **260**: 1771-1772
3. Rognan D, Scapozza L, Folkers G, Daser A (1995) *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 753-757
4. Germain RN (1994) *Cell* **76**: 287-299
5. Momburg F, Neefjes JJ, Hammerling GJ (1994) *Curr Opin Immunol* **6**: 32-37
6. Hill A, Ploegh H (1995) *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 341-343
7. Peters J-M (1994) *TIBS* **19**: 377-382
8. Kovacsics-Bankowski M, Rock KL (1995) *Science* **267**: 243-246
9. Tscherning T, Claesson MH (1994) *Scand J Immunol* **39**: 117-121
10. Malnati MS, Peruzzi M, Parker KC, Biddison WE, Ciccone E, Moretta A, Long EO (1995) *Science* **267**: 1016-1018
11. Parham P (1994) *Nature* (Lond) **372**: 615-616
12. Balk SP, Burke S, Polischuk JE, Frantz ME, Yang L, Porcelli S, Colgan SP, Blumberg RS (1994) *Science* **265**: 259-262
13. Beckman EM, Porcelli SA, Morita CT, Behar SM, Furlong ST, Brenner MB (1994) *Nature* (Lond) **372**: 691-694
14. Castano AR, Tangri S, Miller JEW, Holcombe HR, Jackson MR, Huse WD, Kronenberg M, Peterson PA (1995) *Science* **269**: 223-226
15. Sieling PA, Chatterjee D, Porcelli SA, Prigozy TI, Mazzaccaro RJ, Soriano T, Bloom BR, Brenner MB, Kronenberg M, Brennan PJ, Modlin RL (1995) *Science* **269**: 227-230
16. Bjorkman PJ, Burmeister WP (1994) *Curr Opin Struct Biol* **4**: 852-856
17. Jones EY (1993) *Curr Opin Struct Biol* **3**: 846-852
18. Collins EJ, Garboczi DN, Karpusas MN, Wiley DC (1995) *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 1218-1221
19. Guo H-C, Jardetzky TS, Garrett TPJ, Lane WS, Strominger JL, Wiley DC (1992) *Nature* (Lond) **360**: 364-366
20. Bjorkman PJ, Saper MA, Samraoui B, Bennett WS, Strominger JL, Wiley DC (1987) *Nature* (Lond) **329**: 506-512
21. Bjorkman PJ, Saper MA, Samraoui B, Bennett WS, Strominger JL, Wiley DC (1987) *Nature* (Lond) **329**: 512-518
22. Austyn JM, Wood KJ (1993) *W: Principles of cellular and molecular immunology*. Oxford University Press, Oxford, str. 239-290, 322
23. Stern LJ, Wiley DC (1994) *Structure* **2**: 245-251
24. Saper MA, Bjorkman PJ, Wiley DC (1991) *J Mol Biol* **219**: 277-319
25. Garrett TPJ, Saper MA, Bjorkman PJ, Strominger JL, Wiley DC (1989) *Nature* (Lond) **342**: 692-696
26. Guo H-C, Madden DR, Silver ML, Jardetzky TS, Gorga JC, Strominger JL, Wiley DC (1993) *Proc Natl Acad Sci USA* **90**: 8053-8057
27. Matsumura M, Fremont DH, Peterson PA, Wilson IA (1992) *Science* **257**: 927-934
28. Parham P, Lomen CE, Lawlor DA, Ways JP, Holmes N, Coppin HL, Salter RD, Wan AM, Ennis PD (1988) *Proc Natl Acad Sci USA* **85**: 4005-4009
29. Cowan EP, Jelachich ML, Biddison WE, Coligan JE (1987) *Immunogenetics* **25**: 241-250
30. Madden DR, Gorga JC, Strominger JL, Wiley DC (1991) *Nature* (Lond) **353**: 321-325
31. Madden DR, Gorga JC, Strominger JL, Wiley DC (1992) *Cell* **70**: 1035-1048
32. Madden DR, Garboczi DN, Wiley DC (1993) *Cell* **75**: 693-708
33. Silver ML, Guo H-C, Strominger JL, Wiley DC (1992) *Nature* (Lond) **360**: 367-369
34. Bouvier M, Wiley DC (1994) *Science* **265**: 398-402
35. Chen Y, Sidney J, Southwood S, Cox AL, Sakaguchi K, Henderson RA, Appella E, Hunt DF, Sette A, Engelhard VH (1994) *J Immunol* **152**: 2874-2881
36. Collins EJ, Garboczi DN, Wiley DC (1994) *Nature* (Lond) **371**: 626-629
37. Urban RG, Chicz RM, Lane WS, Strominger JL, Rehm A, Kenter MJH, UytdeHaag FGC M, Ploegh H, Uchanska-Ziegler B, Ziegler A (1994) *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 1534-1538
38. Joyce S, Kozushima K, Kepcecs G, Angeletti RH, Nathenson SG (1994) *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 4145-4149
39. Fremont DH, Matsumura M, Stura EA, Peterson PA, Wilson IA (1992) *Science* **257**: 919-927
40. Rohren EM, McCormick DJ, Pease LR (1994) *J Immunol* **152**: 5337-5343
41. Latron F, Pazmany L, Morrison J, Moots R, Saper MA, McMichael A, Strominger JL (1992) *Science* **257**: 964-967
42. Jardetzky TS, Lane WS, Robinson RA, Madden DR, Wiley DC (1991) *Nature* (Lond) **353**: 326-329
43. Taurog JD, El-Zaatari AK (1988) *J Clin Invest* **82**: 987-992
44. de Castro JAL (1994) *Curr Opin Rheumatol* **6**: 371-377
45. Young ACM, Zhang W, Sacchettini JC, Nathenson SG (1994) *Cell* **76**: 39-50
46. Zhang W, Young ACM, Imarai M, Nathenson SG, Sacchettini JC (1992) *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 8403-8407
47. Owen MJ, Lamb JR (1988) *W: Immune Recognition*. IRL Press, Oxford, Washington DC, str. 56-61
48. Hunt DF, Henderson RA, Shabanowitz J, Sakaguchi K, Michel H, Sevilir N, Cox AL, Appella E, Engelhard VH (1992) *Science* **255**: 1261-1263
49. Rammensee H-G, Friede T, Stevanović S (1995) *Immunogenetics* **41**: 178-228
50. Brusica V, Rudy G, Harrison LC (1994) *Nucleic Acids Res* **22**: 3663-3665
51. Rammensee H-G, Falk K, Rotzschke O (1993) *Curr Opin Immunol* **5**: 35-44
52. Colbert RA, Rowland-Jones SL, McMichael AJ, Frelinger JA (1993) *Proc Natl Acad Sci USA* **90**: 6879-6883
53. Szamel M, Resch K (1995) *Eur J Biochem* **228**: 1-15
54. Janeway CA, Bottomly K (1994) *Cell* **76**: 275-285
55. Paul WE, Seder RA (1994) *Cell* **76**: 241-251
56. Harding CV, Unanue E (1990) *Nature* (Lond) **346**: 574-576
57. Corr M, Slanetz AE, Boyd LF, Jelonek MT, Khilko S, Al-Ramadi BK, Kim YS, Maher SE, Bothwell ALM, Margulies DH (1994) *Science* **265**: 946-949
58. Weiss A, Littman DR (1994) *Cell* **76**: 263-274
59. Cammarota G, Schierle A, Takacs B, Doran DM, Knorr R, Bannwarth W, Guardiola J, Sinigaglia F (1992) *Nature* (Lond) **356**: 799-801
60. König R, Huang L-Y, Germain RN (1992) *Nature* (Lond) **356**: 796-798
61. Jakóbsiak M (1995) *W: Jakóbsiak M (red) Immunologia*. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, str. 118-141, 239-244, 258-288
62. Bouteiller PL (1994) *Crit Rev Immunol* **14**: 89-129
63. Buc M (1993) *Folia Biologica* (Praha) **39**: 223-242
64. Engelhard VH (1994) *Curr Opin Immunol* **6**: 13-23

**Prenumerata „Postępów Biochemii” w 1996 r.**

**Prenumerata dla instytucji — 60 zł  
Indywidualna — 28 zł**

**50% zniżki dla członków PTBioch.**

# Zmiany objętości komórek a modulacja ich metabolizmu

## Changes of cell volume and modulation of cellular metabolism

TADEUSZ LIETZ\*

### Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Regulacyjne zmniejszanie i zwiększanie objętości komórki
- III. Czynniki wpływające na objętość komórek
- IV. Zmiany w metabolizmie komórek jako efekt zmian ich objętości
  - IV-1. Objętość komórki a metabolizm białek i aminokwasów
  - IV-2. Wpływ zmian objętości komórek na metabolizm cukrowców
  - IV-3. Wpływ zmian objętości na inne funkcje komórek
- V. Uwagi końcowe

**Wykaz stosowanych skrótów:** RVD — regulacyjne zmniejszanie objętości; RVI — regulacyjne zwiększanie objętości; MDCK — Madin-Darby canine kidney cells

### I. Wstęp

Wyniki badań prowadzonych od końca lat osiemdziesiątych wskazują, że towarzyszące działaniu hormonów oraz czynników niehormonalnych zmiany objętości komórek, mogą wpływać na aktywność tych procesów biochemicznych, którym nie przypisywano dotąd roli w regulacji objętości komórek [1, 2]. Obserwacje te dotyczą głównie komórek wątroby, ale również erytrocytów, komórek kanalików nerkowych, nabłonka jelitowego i innych tkanek. W artykule opisano udział zmian objętości komórek w regulacji ich metabolizmu. Należy jednak podkreślić, że zmiany te wpływają nie tylko na szybkość procesów metabolicznych, ale także oddziałują na ekspresję genów, sekrecję hormonów czy organizację cytoszkieletu [2].

### II. Regulacyjne zmniejszanie i zwiększanie objętości komórki

Pęcznienie lub kurczenie się komórek zachodzi w wyniku zmian osmotyczności płynu zewnątrz- lub wewnątrzkomórkowego i powoduje uruchomienie mechanizmów, które prowadzą do pobierania lub usuwania wody przez komórkę, zapobiegając nadmiernemu wzrostowi lub spadkowi jej objętości. Zdaniem Parkera [3], umożliwia to zachowanie okreś-

### Contents:

- I. Introduction
- II. Regulatory cell volume decrease and increase
- III. Factors influencing cell volume
- IV. Modulation of cell metabolism by cell volume
  - IV-1. Cell volume, protein and amino acid metabolism
  - IV-2. Cell volume and carbohydrate metabolism
  - IV-3. Cell volume and other cell functions
- V. Concluding remarks

lonego stężenia białek wewnątrz komórki („*macromolecular crowding*”) i warunkuje optymalną szybkość wielu reakcji biochemicznych, a zwłaszcza tych, których substratami i produktami są substancje wielkocząsteczkowe.

Utrzymanie stałej objętości komórki jest możliwe w wyniku regulacji zmian wewnątrzkomórkowego stężenia substancji osmotycznie czynnych. Są nimi elektrolity oraz niektóre niskocząsteczkowe substancje organiczne (pewne aminokwasy, metyloaminy, polirole) zwane osmolitami [1, 2, 4-6]. Umieszczenie komórki w środowisku hipotonicznym powoduje szybkie jej pęcznienie, jednakże już po upływie kilku minut komórka niemal całkowicie odzyskuje swoją pierwotną objętość [1, 7]. Takie zachowanie jest określane mianem regulacyjnego zmniejszenia objętości (RVD — *regulatory volume decrease*). Z kolei umieszczenie komórki w środowisku hipertonicznym prowadzi początkowo do jej kurczenia się, a następnie wzrostu objętości, aż do osiągnięcia stanu bliskiego wyjściowemu. Zjawisko to określa się jako regulacyjne zwiększenie objętości (RVI — *regulatory volume increase*).

Adaptacja do zmian osmotyczności środowiska na drodze pobierania lub z usuwania przez komórkę elektrolitów jest procesem wydajnym, nie trwającym dłużej niż kilka minut. Regulacja wewnątrzkomórkowego ciśnienia osmotycznego na drodze zmian stężeń osmolitów powoduje zmniejszanie lub zwiększanie objętości komórki i polega na spadku lub stymulacji aktywności błonowych transporterów osmolitów, a także na modulacji szybkości syntezy lub degradacji tych związków, zarówno w warunkach *in vitro* jak i *in vivo* [8, 9]. Procesy te są na ogół długotrwałe i nie będą przedmiotem niniejszego artykułu.

\* Mgr, Instytut Biochemii U.W., Zakład Regulacji Metabolizmu Al. Żwirki i Wigury 93, 02-089 Warszawa

Mechanizmy regulacyjnego zmniejszania i zwiększania objętości (RVD i RVI) w komórkach nerwowych linii MDCK przedstawiono na rycinie 1. Regulacyjne zmniejszanie objętości komórki jest wynikiem wypływu elektrolitów [1]. Obniżenie osmotyczności płynu perfuzyjnego wpływa na zwiększenie uwalniania jonów  $K^+$ ,  $HCO_3^-$ ,  $Cl^-$  przez komórki wątroby szczura [10-14]. Wpływ jonów potasu obniżają chinidyna lub jony  $Ba^{2+}$  — inhibitory kanałów  $K^+$  [12, 13]. Czynniki te hamują również proces RVD w izolowanych hepatocytach szczura [15]. Przyjmuje się, że wzrost przepuszczalności błony dla jonów  $K^+$  prowadzi do hiperpolaryzacji błony, co z kolei powoduje zwiększanie szybkości transportu anionów przez błonę komórkową i wzrost objętości komórki [10, 16]. Stymulacja transportu  $HCO_3^-$ ,  $Cl^-$  w czasie RVD może być wynikiem aktywacji kanałów transportujących jony  $Cl^-$  [17], stymulacji antyportu  $HCO_3^-/Cl^-$  łącznie z  $K^+/H^+$  [18], kotransportu  $K^+/Cl^-$  [19-22] oraz elektrogennego transportu  $HCO_3^-$  [23].

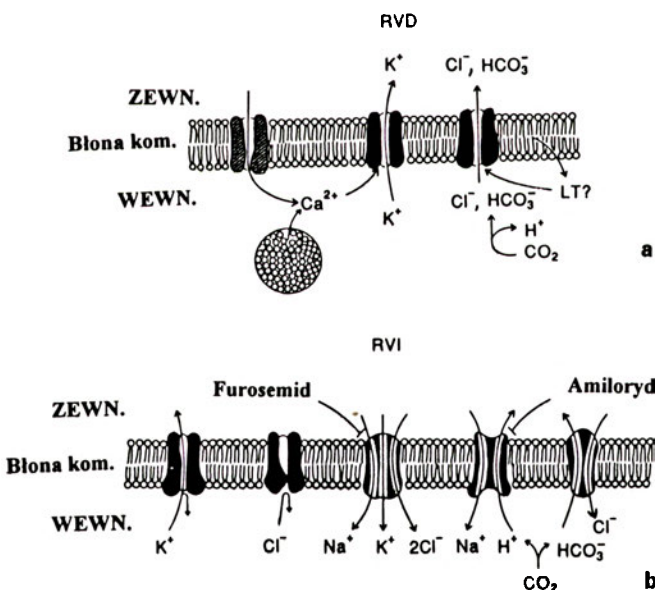
Regulacyjne zwiększanie objętości (RVI) jest wynikiem pobierania jonów przez komórkę. Zwiększony transport elektrolitów może być wynikiem aktywacji kotransportera  $Na^+/K^+/2Cl^-$  [24-28], jednoczesnej stymulacji wymiany  $Na^+/H^+$  i  $HCO_3^-/Cl^-$  [10, 13, 29] lub hamowania aktywności kanałów  $K^+$  i  $Cl^-$  [30]. W perfundowanej wątrobie mechanizmy RVI mogą

być wynikiem zmiany płynu perfuzyjnego izotonicznego na hipertoniczny lub hipotonicznego na izotoniczny [15]. Natomiast w izolowanych hepatocytach nie obserwowano zjawiska RVI po przeniesieniu komórek ze środowiska izotonicznego do hipertonicznego. Regulacyjne zwiększenie objętości hepatocytów zachodzi natomiast w warunkach, gdy osmotyczność płynu zewnątrzkomórkowego jest najpierw obniżona dla wywołania RVD, a następnie zwiększona. Zjawisko to, zwane „wtórnym RVI”, obserwuje się nie tylko w hepatocytach, ale także w innych komórkach [31-34]. Zdaniem Häussera i Langa [1], przyczyną „wtórnego RVI” może być różna zdolność nie naruszonej tkanki wątrobowej i izolowanych hepatocytów do wytwarzania jonów  $H^+$  lub usuwania jonów  $HCO_3^-$ . W warunkach niedostatecznej produkcji protonów aktywacja antyportu  $Na^+/H^+$  w ramach RVI w izolowanych hepatocytach może prowadzić do szybkiego zalkalizowania wnętrza komórki i zahamowania wymiany  $Na^+/H^+$ .

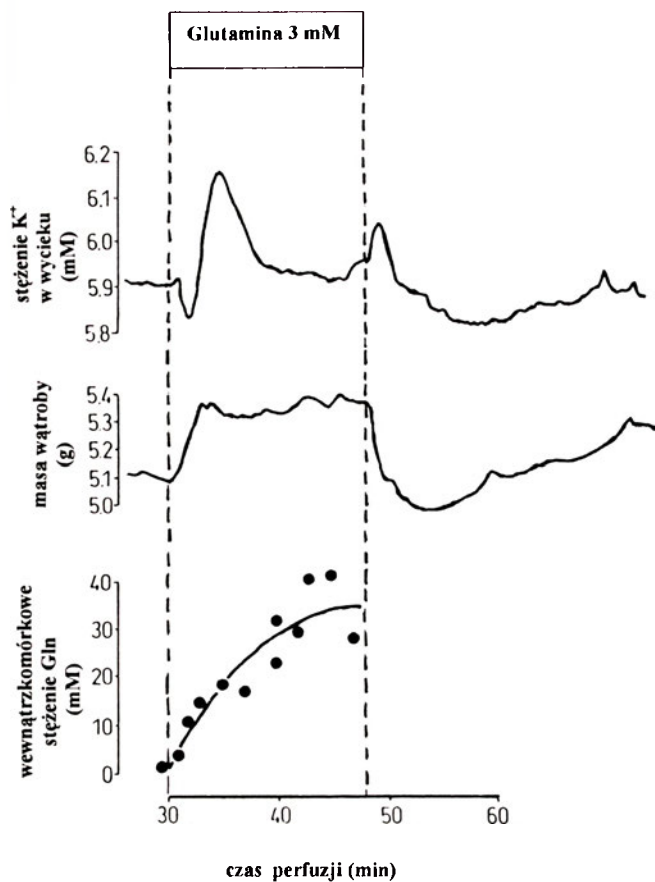
### III. Czynniki wpływające na objętość komórek

Utrzymanie stałej objętości komórki jest związane z wytwarzaniem gradientu stężeń jonów (głównie  $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $HCO_3^-$ ,  $Cl^-$ ) w poprzek błony komórkowej. Kosztem energii ATP, komórki wydalają jony  $Na^+$  na wymianę z jonami  $K^+$ , utrzymując ujemny potencjał błony. Stanowi on siłę napędową dla transportu jonów  $HCO_3^-$  i  $Cl^-$  [35]. Zaburzenia w procesach wytwarzania energii prowadzą do spadku potencjału błonowego, wzrostu wewnątrzkomórkowego stężenia  $HCO_3^-$ ,  $Cl^-$  i pęcznienia komórki [35-39]. Depolaryzacja błony wywołana przez zwiększenie zewnątrzkomórkowego stężenia jonów  $K^+$ , w warunkach zachowania izotoniczności płynu zewnątrzkomórkowego, powoduje wzrost stężenia jonów  $Cl^-$  w komórce i w efekcie — jej pęcznienie [36]. Do wzrostu objętości komórek dochodzi także w warunkach zahamowania aktywności ATP-azy zależnej od jonów  $Na^+$  i  $K^+$  przez strofantynę [36]. Wykazano, że zmiany objętości komórek mogą następować również w warunkach stresu oksydacyjnego [40, 41]. Np. nadtlenuk wodoru wytwarzany wewnątrz komórki w wyniku utleniania monoamin wywołuje kurczenie hepatocytów, prawdopodobnie na skutek stymulacji wrażliwych na jony  $Ba^{2+}$  kanałów  $K^+$ . Jak widać, zmiany objętości komórki mogą następować nie tylko na skutek manipulowania osmotycznością środowiska zewnątrzkomórkowego.

W komórkach nabłonka jelitowego [42], komórkach nabłonkowych kanalików nerkowych [43] czy hepatocytach [44, 45], zachodzi zależny od jonów  $Na^+$  transport metabolitów, takich jak aminokwasy czy glukoza. Wykazano, że dodanie do płynu perfuzyjnego 3 mM glutaminy (Ryc. 2) powoduje zwiększenie pobierania tego aminokwasu przez hepatocyty aż do osiągnięcia stężenia 35 mM [46]. W ciągu pierwszych 2 min nagromadzenia glutaminy dochodzi do zwiększenia



**Ryc. 1** Transport jonów przez błonę komórkową w czasie regulacyjnego zmniejszania i zwiększania objętości (RVD i RVI)  
 a) RVD. Pęcznienie komórek powoduje aktywację kanałów  $K^+$  oraz kanałów transportujących aniony. Spadek stężenia jonów wewnątrz komórki obniża ciśnienie osmotyczne, powoduje wypływ wody i zmniejszenie objętości komórki. Kanały  $K^+$  mogą być aktywowane przez jony  $Ca^{2+}$  pochodzące ze środowiska zewnątrzkomórkowego lub uwalniane z magazynów wewnątrzkomórkowych. Leukotrieny (LT) mogą stymulować aktywność kanałów transportujących aniony.  
 b) RVI. Kurczenie komórki powoduje aktywację kotransportu  $Na^+/K^+/Cl^-$  oraz antyportu  $Na^+/H^+$  i wymiennicza  $HCO_3^-/Cl^-$ . Aktywność kanałów  $K^+$  i  $Cl^-$  spada, co zapobiega utracie tych jonów przez komórkę (Wg F. Langa i w s p. [2], za zgodą wydawnictwa)



**Ryc. 2** Wpływ glutaminy na masę wątroby, poziom jonów  $K^+$  w płynie perfuzyjnym oraz na wewnątrzkomórkowe stężenie glutaminy.

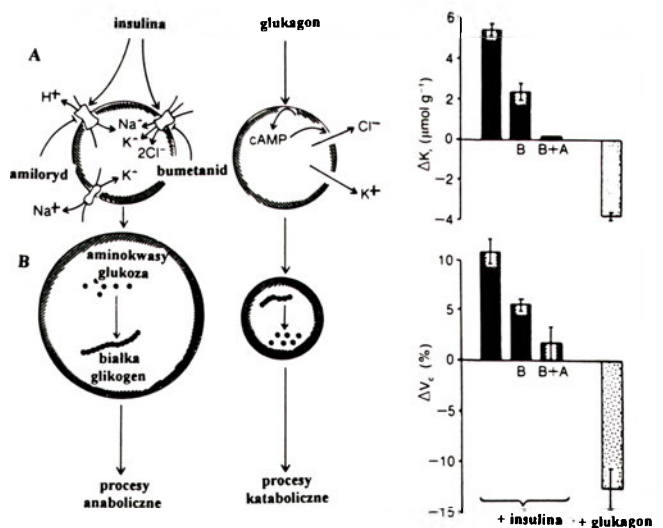
Wątrobę perfundowano izotonicznym buforem Krebsa-Henseleita (305 mosmol/l) przez 30 min i następnie dodawano 3 mM glutaminę do płynu perfuzyjnego. Wewnątrzkomórkowe stężenie glutaminy oznaczano po zamrożeniu tkanki po określonym czasie perfuzji. W nieobecności glutaminy w płynie perfuzyjnym, wewnątrzkomórkowe stężenie tego aminokwasu wynosiło poniżej 1 mM. Doświadczenia przeprowadzono w warunkach zahamowania syntazy glutaminowej przez dodanie do płynu perfuzyjnego sulfoksyminy metioniny, inhibitora tego enzymu. Wzrost stężenia glutaminy w komórkach był zatem wynikiem zwiększonego jej pobierania. (Wg D. Häussingera i w sp. [46], za zgodą wydawnictwa).

masy wątroby, będącego rezultatem wzrostu stopnia uwodnienia komórek. Akumulacji glutaminy towarzyszy w początkowej fazie nieznaczna stymulacja pobierania jonów  $K^+$  przez wątrobę, jednakże już po ok. 2 min stężenie tych jonów w płynie wypływającym z wątroby gwałtownie wzrasta, mimo dalszego nagromadzenia się glutaminy w komórkach. Proces pęcznienia komórek zostaje zatrzymany, jednak powrót masy wątroby do wartości wyjściowej następuje dopiero po usunięciu glutaminy z płynu perfuzyjnego. Pęcznienie komórek wątroby oraz stymulację kompensacyjnego wydalania jonów  $K^+$  wykazano również w obecności takich aminokwasów jak alanina, prolina, seryna, glicyna, fenyloalanina, hydroksyprolina, a także w obecności mieszaniny aminokwasów dodanych do płynu perfuzyjnego w stężeniach fizjologicznych [44-48]. Co więcej, zależne od aminokwasów pęcznienie komórek stwierdzono w izolowanych kanałkach proksymalnych nerki [49, 50] oraz w komórkach

nabłonkach jelit [42]. W kanałkach proksymalnych nerki królika, aktywacja kanałów potasowych w odpowiedzi na pęcznienie wywołane pobieraniem aminokwasu prowadzi do niemal całkowitego odzyskania początkowej objętości komórek [43, 50].

Do zmian objętości hepatocytów dochodzi również w wyniku działania hormonów. Np. serotonina, wazopresyna i cAMP powodują obniżenie, a adrenalina zwiększenie zawartości wody wewnątrzkomórkowej w perfundowanej wątrobie szczura [1, 7]. Najwięcej jednak informacji o mechanizmach hormonalnej regulacji objętości komórki uzyskano w odniesieniu do insuliny i glukagonu (Ryc. 3A). Wykazano, że insulina powoduje stymulację antyportu  $Na^+/H^+$  oraz symportu  $Na^+/K^+/2Cl^-$ , co prowadzi do wzrostu stężenia jonów  $K^+$  w komórce i w rezultacie do jej pęcznienia [51-53]. Glukagon stymuluje ATP-azę zależną od jonów  $Na^+$  i  $K^+$  [54], powoduje spadek wewnątrzkomórkowego stężenia jonów  $K^+$  w perfundowanej wątrobie szczura i kurczenie się komórek prawdopodobnie wskutek aktywacji kanałów  $K^+$  hamowanych przez  $Ba^{2+}$  i chinidynę [53, 55]. Co więcej, glukagon hamuje wywołane obecnością insuliny pęcznienie hepatocytów [1, 7].

Dane dotyczące zakresu zmian objętości komórek zachodzących w hepatocytach pod wpływem działania niektórych hormonów i aminokwasów przedstawiono w tabeli 1. Z wyników tych widać, że zmiany objętości następujące po dodaniu efektorów zachodzą na ogół



**Ryc. 3** Wpływ insuliny i glukagonu na objętość oraz metabolizm hepatocytów.

A. Insulina aktywuje wrażliwy na amiloryd (A) wymienniczą  $Na^+/H^+$  oraz hamowany przez bumetanid (B) kotransporter  $Na^+/H^+/2Cl^-$ , jak również ATP-azę zależną od jonów  $Na^+$  i  $K^+$ , co powoduje wzrost stężenia jonów potasu ( $\Delta K_i$ ) w komórkach i ich pęcznienie. Zarówno akumulacja  $K^+$ , jak i pęcznienie komórek są hamowane w obecności amiloridu i bumetanidu. Glukagon i cAMP powodują uwalnianie jonów potasu przez hepatocyty na drodze aktywacji kanałów  $Cl^-$  oraz kanałów  $K^+$  hamowanych przez chinidynę i  $Ba^{2+}$ , doprowadzając do kurczenia się komórek. B. Pęcznienie hepatocytów powoduje stymulację procesów anabolicznych, natomiast kurczenie aktywuje procesy kataboliczne. (Wg D. Häussingera i F. Langa [1], za zgodą wydawnictwa)

**Tabela 1.**

Wpływ hormonów i aminokwasów na zawartość wody w komórkach wątroby

Hormon / aminokwas	Zmiana zawartości wody (% kontroli)	
	+	-
Insulina (35 nM)	12 ± 1	
Glukagon (100 nM)		14 ± 3
cAMP (50 μM)		9 ± 1
Wazopresyna (15 nM)		2 ± 2
Adrenalina (5 μM)	8 ± 1	
Wazopresyna (15 nM) + glukagon (100 nM)		23 ± 3
Wazopresyna (15 nM) + cAMP (15 μM)		16 ± 1
Insulina (35 nM) + glukagon (100 nM)	3 ± 3	
Glutamina (1 mM)	5 ± 1	
Glutamina (3 mM)	10 ± 1	
Glicyna (2 mM)	5 ± 0	
Glicyna (2 mM) + Glutamina (2 mM)	13 ± 2	

Wewnątrzkomórkową zawartość wody oznaczano w perfundowanej wątrobie szczura przy użyciu [<sup>3</sup>H] inuliny i [<sup>14</sup>C] mocznika [55]. Objętość wewnątrzkomórkowej wody zmierzona bez efektów (kontrola) wynosiła 546 ± 9 μl/g. Wyniki oznaczają procentowe zmiany objętości wątroby po 30 minutach od podania efektora. Wartości pozytywne wskazują pęcznienie, a negatywne — kurczenie się komórek. Zestawione wyniki pochodzą z pracy Häussingera i Langa [1].

w granicach kilku — kilkunastu procent.

#### IV. Zmiany w metabolizmie komórek jako efekt modulacji ich objętości

Zmiany objętości komórek mogą *per se* wywierać wpływ na szybkość przemian metabolicznych w nich zachodzących. Wykazano, że pęcznienie komórek prowadzi do aktywacji procesów anabolicznych takich, jak np. synteza białek i glikogenu, a także do hamowania procesów katabolicznych (proteoliza, glikogenoliza). Kurczenie komórek powoduje natomiast efekty przeciwne (por. Ryc. 3B). Modulacje objętości, następujące w wyniku działania nie tylko aminokwasów i hormonów, lecz także zmian toniczności płynu zewnątrzkomórkowego, oddziałują na metabolizm komórek już po upływie kilku minut od podania czynnika powodującego ich pęcznienie lub kurczenie. Zmiany w metabolizmie mogą trwać nawet po wyłączeniu mechanizmów kompensujących zmiany osmotyczności płynu wewnątrzkomórkowego (tj. RVD i RVI) [1]. Zmiany stopnia uwodnienia cytoplazmy, będące wynikiem modulacji transportu jonów przez hormony, mogą być zatem uznane jako wtórny przekaznik (second messenger) w działaniu tych hormonów [1, 35]. Według Häussingera i wsp. [7], również transport aminokwasów zależy od jonów sodowych rozpatrywać należy nie tylko jako system translokacji tych związków przez błonę komórkową,

lecz także jako układ sygnałowy, wpływający na funkcje komórki przez zmiany jej objętości. Przypisanie transportowi aminokwasów takiej funkcji rzuca nowe światło na problem heterogenności systemów transportu aminokwasów wśród różnych typów komórek oraz na kwestię zróżnicowanej ekspresji tych systemów podczas rozwoju.

Jeśli przyjmiemy, że zmiany objętości komórki *per se* regulują jej funkcje, to powstaje pytanie, jakie struktury komórkowe rozpoznają te zmiany, a także jakie mechanizmy sygnałowe odpowiadają za zmiany metabolizmu komórki pojawiające się jako skutek modulacji jej objętości [7]. Wiadomo, że w wyniku pęcznienia hepatocytów, dochodzi do aktywacji nieselektywnych kanałów transportujących kationy, regulowanych przez stopień naprężenia błony komórkowej (*stretch — activated cation channels*) [56]. Wzrost stężenia jonów Ca<sup>2+</sup> w cytoplazmie zwiększa szybkość transportu jonów K<sup>+</sup> przy udziale kanałów stymulowanych przez jony Ca<sup>2+</sup> [57] (Ryc. 1). Występowanie nieselektywnych kanałów jonowych regulowanych przez naprężenie błony komórkowej stwierdzono także w innych tkankach [58, 59]. W komórkach kanalików proksymalnych nerki, na przykład, wykazano obecność kanałów K<sup>+</sup>, które aktywuje wzrost naprężenia błony komórkowej [60], a w hepatocytach wykryto kanały K<sup>+</sup>, których aktywność nie zależy od jonów Ca<sup>2+</sup> [61]. Co więcej, zmiany potencjału błonowego — będące efektem modulacji aktywności kanałów jonowych w trakcie pęcznienia lub kurczenia komórek — mogą wpływać na przepuszczalność kanałów Ca<sup>2+</sup> regulowanych przez potencjał błonowy [35].

Podczas RVD w kanalikach proksymalnych nerki dochodzi do zwiększenia intensywności pobierania jonów Ca<sup>2+</sup> przez komórki. Proces ten obniża toksyna krztuśca, co sugeruje udział białek G w odpowiedzi na zmiany objętości [62]. Pęcznienie komórek wątroby w środowisku hipotonicznym powoduje stymulację syntezy 1,4,5-fosforanu inozytoli [63, 64].

Mechanizmy regulacji aktywności kanałów transportujących aniony są słabiej poznane. Wykazano jednak, że np. w komórkach MDCK [65] niektóre eikosanoidy stymulują aktywność kanału transportującego jony HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> i Cl<sup>-</sup> (nie wykazano tego jednak w hepatocytach [64]). Co więcej, pęcznienie i kurczenie komórek może wpływać na stopień ufosforylowania białek. Pęcznienie komórek drożdży stymuluje kinazy białkowe aktywowane przez mitogeny (MAP-kinazy) [66]. Wzrost objętości hepatocytów w środowisku hipotonicznym prowadzi również do zwiększenia aktywności wspomnianych kinaz [67]. Hamowaniu proteolizy przez aminokwasy w hepatocytach towarzyszy stymulacja fosforylacji jednego z białek rybosomalnych [68]. Zdaniem niektórych autorów [3, 69] istotną rolę w regulacji metabolizmu komórki mogą odgrywać zmiany stężenia białek („*macromolecular crowding*”) następujące w wyniku zmian stopnia uwodnienia cytoplazmy w trakcie pęcznienia lub kurczenia komó-

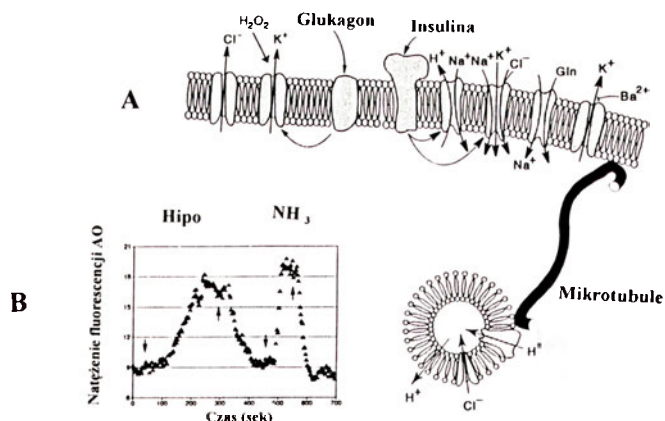
rek. Zmiany te wpływają na aktywność enzymatyczną oraz na stopień asocjacji białek z błonami, mogą więc wywierać wpływ na aktywność enzymów katalizujących reakcje fosforylacji / defosforylacji.

#### IV-1. Objętość komórki a metabolizm białek i aminokwasów

Regulacja szybkości proteolizy w hepatocytach przez insulinę, glukagon i aminokwasy jest faktem znanym już od dość dawna, jednakże mechanizm tego zjawiska pozostawał nie wyjaśniony [70, 71]. Obecnie wydaje się, że zmiany objętości komórki odgrywają istotną rolę w kontroli metabolizmu białek przez hormony i aminokwasy. Insulina, wywołująca pęcznienie hepatocytów, hamuje szybkość proteolizy oraz stymuluje syntezę białka, podczas gdy indukujący kurczenie hepatocytów glukagon wykazuje działanie przeciwne [1, 7]. Pęcznienie komórek — wywołane obniżeniem toniczności płynu zewnątrzkomórkowego [47, 48], obecnością glutaminy [72], alaniny, proliny czy seryny [48] lub też zahamowaniem aktywności kanałów  $K^+$  przez jony  $Ba^{2+}$  [7] — powoduje stymulację syntezy białka i obniżenie szybkości proteolizy w hepatocytach. Z kolei kurczeniu komórek w środowisku hipertonicznym towarzyszy stymulacja procesu proteolizy oraz zahamowanie syntezy białka [72]. Zdaniem L a n g a i w s p. [35], zjawiska te mogą być uznane za formy regulacyjnego zmniejszania i zwiększania objętości. Stymulacja proteolizy w komórkach skurczonych może bowiem prowadzić do zwiększenia wewnątrzkomórkowego stężenia aminokwasów i wzrostu toniczności cytoplazmy.

Uzyskane dotychczas dane wskazują na istotną rolę cytoszkieletu w procesie indukowanego przez insulinę pęcznienia komórek [73-76]. Uszkodzenie struktury mikrotubul za pomocą kolchicyny znosi przeciwproteolityczne działanie insuliny [74]. Zastosowanie oranżu akrydyny jako fluorescencyjnego wskaźnika pH w lizosomach, wykazało, że indukowanemu przez insulinę wzrostowi objętości komórki towarzyszy alkalizacja wnętrza lizosomów, a kurczeniu komórek — spadek pH w tych organellach [77] (Ryc. 4). Ponieważ wewnątrzkomórkowa proteoliza zachodząca w wakuolach autofagalnych zależy od stopnia zakwaszenia lizosomów, można przypuszczać, że zmiany lizosomalnego pH stanowią element łączący stopień uwodnienia cytoplazmy z szybkością degradacji białek.

Jak wspomniano wcześniej (patrz: rozdz. III), zależny od jonów  $Na^+$  transport aminokwasów odgrywa istotną rolę w regulacji objętości komórek. Badania z zastosowaniem perfundowanej wątroby oraz izolowanych hepatocytów szczura wykazały, że pęcznieniu i kurczeniu komórek wątroby towarzyszą znaczne zmiany w metabolizmie aminokwasów. Pęcznienie komórek stymuluje szybkość transportu aminokwasów [46, 78-80], aktywność glutaminazy w hepatocytach [46] oraz utlenianie glicyny w perfundowanej



Ryc. 4 Hipotetyczny mechanizm wpływu insuliny, glukagonu i glutaminy na zmiany pH w lizosomach hepatocytów

A. Insulina, glutamina i jony  $Ba^{2+}$  powodują pęcznienie hepatocytów, podczas gdy glukagon i nadtlarki wywołują kurczenie się komórek. Zmiany stopnia uwodnienia cytoplazmy wpływają na pH lizosomalne prawdopodobnie za pośrednictwem struktur cytoszkieletu.

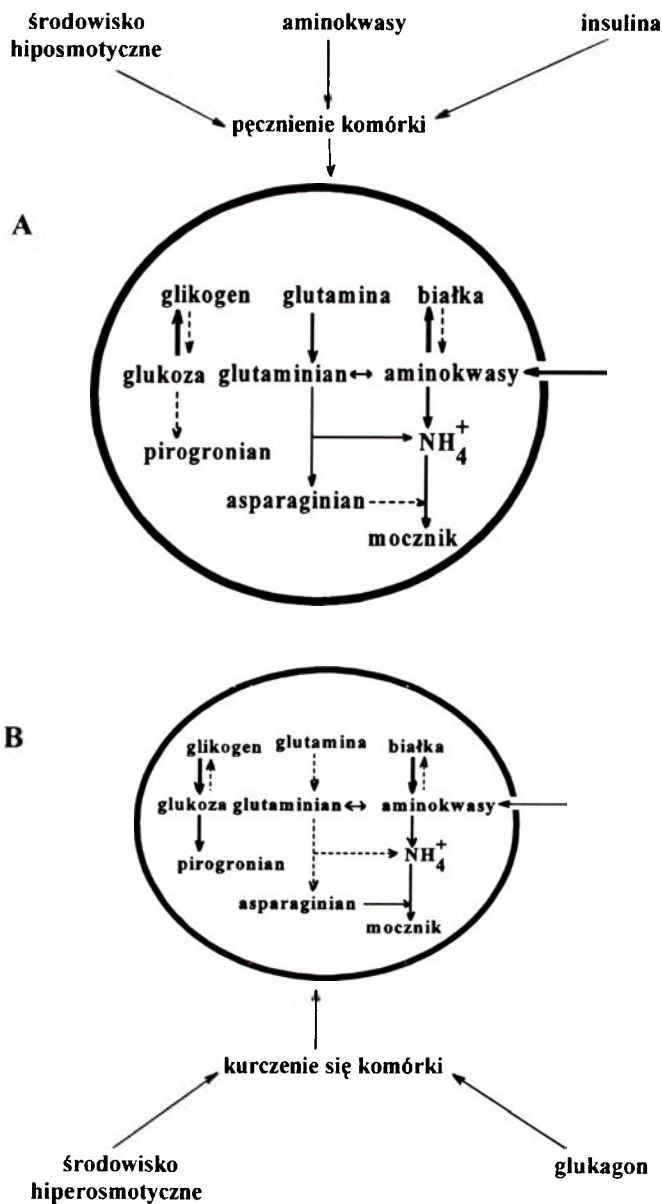
B. Na wykresie przedstawiono wpływ pęcznienia komórek wywołanego 25% obniżeniem osmotyczności płynu zewnątrzkomórkowego (Hipo) na fluorescencję oranżu akrydyny (AO). Dodatkowo pokazano zmiany fluorescencji w wyniku dodania 2 mM  $NH_4Cl$  ( $NH_3$ ). Fluorescencja zwiększa się w wyniku alkalizacji wnętrza lizosomów. (Wg F. L a n g a i w s p. [35], za zgodą wydawnictwa).

wątrobie szczura [81]. Obniżenie toniczności płynu perfuzyjnego, zawierającego mieszaninę aminokwasów, powoduje zwiększenie wytwarzania jonów amonowych oraz mocznika [82, 83]. Stopień uwodnienia cytoplazmy wpływa prawdopodobnie także na aktywność transportu równoważników redukujących z cytosolu do mitochondriów za pośrednictwem układu jablczan/asparagian [82].

Stopień indukowanych przez aminokwasy zmian objętości komórek jest — zdaniem H ä u s s i n g e r a i L a n g a [1] — w dużym stopniu uwarunkowany zdolnością komórek do utrzymywania gradientu stężenia tych związków w poprzek błony komórkowej. Wewnątrzkomórkowe przemiany aminokwasów mogą bowiem prowadzić do wytwarzania metabolitów łatwo przenikających przez błonę komórkową i w ten sposób znosić różnice osmotyczności. Na przykład zahamowanie metabolizmu alaniny przez inhibitory transaminaz znacznie zwiększa indukowany przez alaninę wpływ jonów  $K^+$  z komórek wątroby [83]. Hormony wpływające na metabolizm aminokwasów mogą więc przyczyniać się do regulacji objętości komórki. Zmiany metaboliczne w hepatocytach następujące w wyniku zmian ich objętości zostały podsumowane na rycinie 5.

#### IV-2. Wpływ zmian objętości komórek na metabolizm cukrowców

Pęcznienie i kurczenie komórek wątroby wpływa na szybkość syntezy i degradacji glikogenu. Wzrost objętości hepatocytów w środowisku hipotonicznym powoduje zahamowanie glikogenolizy, prawdopodobnie na skutek obniżenia aktywności formy a fos-



Ryc. 5 Rola zmian objętości hepatocytów w regulacji ich metabolizmu.

A. Pęcznienie komórek wywołane obniżeniem osmotyczności płynu zewnątrzkomórkowego, a także działaniem insuliny lub aminokwasów stymuluje syntezę glikogenu, białek, pobieranie aminokwasów oraz aktywność glutaminazy. W warunkach tych obniżeniu ulega aktywność glikolizy, glikogenolizy i degradacji białek. B. Obniżenie objętości komórek powoduje aktywację degradacji glikogenu, białek, stymuluje glikolizę oraz wytwarzanie jonów amonowych i mocznika. (Wg D. Häussingera i F. Langa [1], za zgodą wydawnictwa).

forylazy glikogenu, podczas gdy kurczenie komórek prowadzi do aktywacji tego enzymu [84]. Jak wspomniano wcześniej, wyniki uzyskane w kilku laboratoriach wskazują na związek między zmianami objętości komórki a aktywnością procesów fosforylacji / defosforylacji białek [66-68]. Wykazano ponadto, że zmiany wewnątrzkomórkowego stężenia jonów  $\text{Cl}^-$  towarzyszące pęcznieniu lub kurczeniu komórek mogą odgrywać istotną rolę w regulacji aktywności fosforylasy glikogenu [85]. Pęcznienie hepatocytów szczura w obecności takich aminokwasów jak glutamina, prolina, asparagina prowadzi do stymulacji syntezy

glikogenu [86-89]. Wykazano, że efekt ten jest wynikiem aktywacji fosfatazy syntazy glikogenu i nie może być przypisany metabolitom powstającym w trakcie przemian aminokwasów [90]. Należy zauważyć, że zmiany w szybkości degradacji lub syntezy glikogenu wywołane pęcznieniem lub kurczeniem się komórek, mogą zostać uznane (analogicznie do procesów syntezy i degradacji białek) za mechanizmy regulacyjnego zwiększania lub zmniejszania objętości [35].

Zmiany w metabolizmie cukrowców towarzyszące pęcznieniu lub kurczeniu się hepatocytów nie ograniczają się do modulacji syntezy i degradacji glikogenu. Pęcznieniu hepatocytów bowiem towarzyszy obniżenie aktywności glikolizy [84], spadek aktywności glukozy-6-fosfatazy [91] oraz stymulacja cyklu pentozofosforanowego [92]. Co więcej, w odpowiedzi na wzrost objętości komórek wątroby umieszczonych w środowisku hipotonicznym, następuje podniesienie poziomu mRNA karboksykinazy fosfoenolpirogonianowej — kluczowego enzymu glukoneogenezy [78]. Wykazano też, że dodanie 10 mM asparagianu do izolowanych kanalików kory nerki królika inkubowanych w obecności glicerolu lub mleczanu, indukuje pęcznienie komórek i hamuje szybkość glukoneogenezy w porównaniu z aktywnością tego procesu obserwowaną w obecności 1 mM stężenia aminokwasu, nie wpływającego na objętość kanalików [49].

#### IV-3. Wpływ zmian objętości na inne funkcje komórek

Zmiany objętości komórki mogą również wpływać na aktywność innych procesów. Wykazano, że w następstwie pęcznienia komórek wątroby w obecności aminokwasów lub insuliny, bądź w warunkach obniżenia osmotyczności płynu zewnątrzkomórkowego dochodzi do znacznej stymulacji transportu taurocholalanu do kanalików żółciowych [93-94]. Wzrostu szybkości transportu taurocholalanu nie można wytłumaczyć ani zmianami poziomu ATP w komórce (transport jest zależny od ATP), ani zmianami potencjału błonowego. Stymulacja transportu kwasów żółciowych jest natomiast znoszona w obecności kolchicyny, co wskazuje na rolę cytoszkieletu w tym procesie [95]. Istnieją dane wskazujące, że wzrost objętości komórki powoduje szybkie (trwające minuty) przemieszczanie się transporterów kwasów żółciowych z pęcherzyków, w których są magazynowane na terenie cytoplazmy, do błony kanalików żółciowych [93-97].

Pęcznienie komórek  $\beta$  trzustki prowadzi początkowo do hiperpolaryzacji błony komórkowej w wyniku zwiększenia aktywności kanałów  $\text{K}^+$ , po czym następuje depolaryzacja, prawdopodobnie w wyniku stymulacji transportu anionów na zewnątrz komórek. Depolaryzacja błony powoduje aktywację kanałów  $\text{Ca}^{2+}$  regulowanych przez potencjał błonowy, wzrost stężenia jonów  $\text{Ca}^{2+}$  w cytozolu i stymulację wydzielania insuliny z pęcherzyków sekrecyjnych [35].



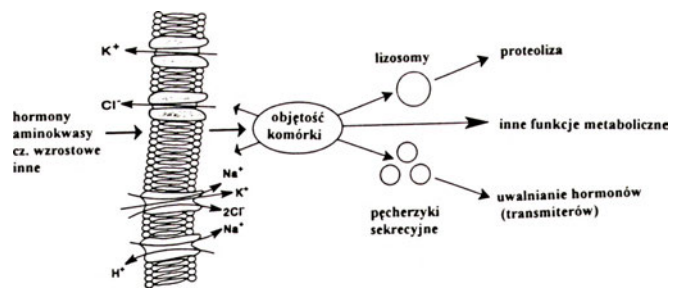
Zmiany objętości komórek mogą pośredniczyć również w działaniu czynników wzrostowych. Wykazano, że szereg takich czynników stymuluje aktywność biorącego udział w regulacji objętości komórki wymiennicza  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ , a także zwiększa szybkość kotransportu  $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$  [98]. Stwierdzono również, że w warunkach wzmożonej ekspresji onkogenu *ras* w jednej z linii fibroblastów, dochodzi do pęcznienia komórek [98] oraz wzrostu pH w lizosomach [99].

## V. Uwagi końcowe

Objętość komórek zmieniać się może w czasie kilku — kilkunastu minut, tak pod wpływem czynników hormonalnych (np. insuliny lub glukagonu), jak i niehormonalnych (np. w obecności zwiększonych stężeń aminokwasów). Zachodzące w niewielkim zakresie zmiany objętości komórki działają *per se* jako silny sygnał modulujący aktywność szeregu procesów metabolicznych (np. syntezy i degradacji białek i glikogenu, metabolizmu aminokwasów), a także innych funkcji (np. sekrecji kwasów żółciowych) i mogą być uznane jako swoisty przekaznik pośredniczący w działaniu hormonów oraz czynników wzrostowych (Ryc. 6). Zmiany objętości komórki zachodzące w następstwie aktywacji zależnego od jonów  $\text{Na}^+$  transportu aminokwasów świadczą, że aminokwasy, wpływając m.in. na aktywność przemian białek i glikogenu, mogą wykazywać podobne do hormonów działanie, wykorzystując zmiany objętości komórki jako system sygnałowy.

Najważniejszym celem dalszych badań nad wpływem zmian objętości komórek na ich metabolizm będzie poszukiwanie mechanizmów odpowiedzialnych za to zjawisko, a w szczególności za przekazywanie informacji o zmianie objętości komórki do układów efektorowych takich jak enzymy, kanały jonowe, transportery błonowe. Intrygująca jest także odpowiedź na pytanie, czy obserwowane *in vitro* zmiany objętości komórek stanowią mechanizm regulacji ich metabolizmu w warunkach *in vivo*. Wykazano, że pęcznienie komórek oraz uruchomienie mechanizmów regulujących ich objętość może zachodzić w obecności fizjologicznych stężeń aminokwasów [46-48]. Indukowane przez glutaminę pęcznienie komórek osiąga połowę swej maksymalnej wartości w obecności 0,6-0,8 mM aminokwasu, tj. przy stężeniach glutaminy występujących w żyłce wrotnej w warunkach normy [83]. Dlatego też wahania stężeń aminokwasów w zakresach fizjologicznych są, być może, skorelowane ze zmianami objętości komórek wątroby w warunkach *in vivo* [48, 83].

Na zakończenie należy dodać, że wyniki badań prowadzonych w różnych laboratoriach [100-art. przeglądowy] wskazują, iż hormony takie jak glukagon, wazopresyna czy adrenalina, mogą wpływać na metabolizm hepatocytów za pośrednictwem zmian objętości mitochondriów. Hormony te powodują wzrost objętości mitochondriów, czemu towarzyszą liczne zmiany w metabolizmie tych organelli. Pęcz-



Ryc. 6 Zmiany objętości jako przekaznik informacji w komórce. (Wg F. Langa i wsp. [35], za zgodą wydawnictwa).

nienie mitochondriów może prowadzić do aktywacji takich procesów jak oddychanie, synteza ATP i cytruliny, karboksylacja pirogronianu czy hydroliza glutaminy. Wydaje się, że istotną rolę w indukowanych przez hormony zmianach objętości mitochondriów odgrywają wahania stężenia jonów wapnia. Wykazano bowiem, że towarzyszący działaniu hormonów wzrost stężenia jonów  $\text{Ca}^{2+}$  w mitochondriach powoduje spadek aktywności pirofosfatazy i zwiększenie wewnątrzmitochondrialnego stężenia pirofosforanu, który stymuluje transport jonów  $\text{K}^+$  do wnętrza mitochondriów, wywołując ich pęcznienie.

## Podziękowania

Serdecznie dziękuję Pani prof. dr hab. Jadwidze Bryle za udzielenie mi cennych rad i wskazówek podczas przygotowywania tej pracy oraz Panu mgr Mariuszowi Więckowskiemu za pomoc w opracowywaniu manuskryptu.

Praca finansowana przez Komitet Badań Naukowych (Projekt badawczy nr 6 P04A 024 08)

Artykuł otrzymano 26 września 1995 r.  
Zaakceptowano do druku 30 listopada 1995 r.

## Piśmiennictwo

- Häussinger D, Lang F (1991) *Biochem Biophys Acta* 1071: 331-350
- Lang F, Ritter M, Völkl H, Häussinger D (1993) *Renal Physiol Biochem* 16: 48-65
- Parker JC (1993) *Am J Physiol* 265: C1191-C1200
- Forster RP, Goldstein L (1979) *J Biol Med* 52: 497-515
- Pollock AS, Arief AI (1980) *Am J Physiol* 239: F165-F205
- Yancey PH, Clark ME, Hand SC, Bowlus RD, Somero GN (1982) *Science Wash DC* 217: 1214-1222
- Häussinger D, Lang F, Gerok W (1994) *Am J Physiol* 267: E343-E355
- Strange K (1994) *NIPS* 9: 223-228
- Jackson PS, Strange K (1993) *Cell Physiol* 34: C1498-1500
- Graf J, Haddad P, Häussinger D, Lang F (1988) *Renal Physiol Biochem* 11: 202-220
- Haddad P, Graf J (1989) *Am J Physiol* 257: G357-G363
- Haddad P, Thalhammer T, Graf J (1989) *Am J Physiol* 256: G563-G569
- Häussinger D, Stehle T, Lang F (1990) *Hepatology* 11: 243-254
- Lang F, Stehle T, Häussinger D (1989) *Pflügers Arch* 411: 209-216
- Corasanti JG, Gleeson D, Boyer JL (1990) *Am J Physiol* 258: 290-298
- Hudson LR, Schultz SG (1988) *Proc Natl Sci USA* 85: 279-283
- Fujimoto M, Mori Y, Hagiwara N, Kubota T, Kotera K (1994) *Japanese J Physiol* 44: Suppl. 2, S43-S48

18. Cala PM (1983) *J Gen Physiol* **82**: 761-784
19. Lauff PK (1982) *J Comp Physiol* **146**: 9-16
20. Kregenow FM (1986) *Annu Rev Physiol* **43**: 493-506
21. Dunham PB, Ellory JC (1981) *J Physiol* **318**: 511-530
22. O'Neil WC (1987) *Am J Physiol* **253**: C883-888
23. Völk H, Lang F (1988) *Pflügers Arch* **411**: 514-519
24. Bakker-Grunwald T (1981) *Biochim Biophys Acta* **641**: 427-431
25. Duhm J, Göbel BO (1984) *Am J Physiol* **246**: C20-C29
26. Adragna NC, Tosteson DC (1984) *J Member* **78**: 43-52
27. Tivey DR, Simmons NL, Aito JF (1985) *J Member Biol* **87**: 93-105
28. Blumenfeld JD, Grossman EB, Sun AM, Hebert SC (1989) *Kidney Int* **36**: 434-440
29. Lohr JW, Sullivan LP, Cragoe JJ (1989) *Am J Physiol* **256**: F622-F631
30. Weiss H, Ritter M, Steidl M, Lang F (1991) *Pflügers Arch* **418**: R64 (abstract)
31. Gagnon J, Ouimet D, Nguyen H, Laprade R, Le Grimellec C, Carrière C, Cardinal J (1982) *Am J Physiol* **243**: F408-F415
32. Grinstein S, Goetz JD, Cohen S, Furuya W, Rothstein A, Gelfand EW (1985) *Mol Physiol* **8**: 185-198
33. Grinstein S, Rothstein A, Cohen S (1985) *J Gen Physiol* **85**: 765-787
34. Hebert SC (1986) *Am J Physiol* **250**: C907-C919
35. Lang F, Bush GL, Völk H, Häussinger D (1995) *NIPS* **10**: 18-22
36. Weinberg JM, Davis JA, Abarzua M, Smith RK, Kunkel R (1990) *Am J Physiol* **258**: F346-F355
37. Lang F, Messner G, Wang W, Oberleitner H (1983) *Klin Wochenschr* **61**: 1029-1037
38. Lang F, Messner G, Wang W, Paulmichl M, Oberleitner H, Deetjen P (1884) *Pflügers Arch* **401**: 14-21
39. Macnigh ADC, Leaf A (1977) *Physiol Rev* **57**: 510-573
40. Hallbrucker CF, Lang F, Gerok W, Häussinger D (1993) *Eur J Biochem* **211**: 449-458
41. Saha N, Schreiber vom Dahl S, Lang F, Gerok W, Häussinger D (1993) *Biochem J* **296**: 701-707
42. Shultz SG (1981) *Am J Physiol* **241**: F579-F590
43. Lang F, Messner G, Rehwald W (1986) *Am J Physiol* **250**: F953-F962
44. Bakker-Grunwald T (1983) *Biochim Biophys Acta* **731**: 239-242
45. Baquet A, Hue L, Meijer AJ, van Woerkom GM, Plomp PJAM (1990) *J Biol Chem* **265**: 955-959
46. Häussinger D, Lang F, Bauers K, Gerok W (1990) *Eur J Biochem* **188**: 689-695
47. Häussinger D, Hallbrucker C, vom Dahl S, Lang F, Gerok W (1990) *Biochem J* **272**: 239-242
48. Hallbrucker C, vom Dahl S, Lang F, Häussinger D (1991) *Eur J Biochem* **197**: 717-724
49. Lietz T, Bryła J (1995) *Arch Biochem Biophys* **321**: 501-509
50. Beck JS, Potts DJ (1990) *J Physiol* **425**: 369-378
51. Jakubowski J, Jakob A (1990) *Eur J Biochem* **193**: 541-549
52. Hallbrucker C, vom Dahl S, Lang F, Gerok W, Häussinger D (1991) *Eur J Physiol* **199**: 467-474
53. Hallbrucker C, vom Dahl S, Lang S, Gerok W, Häussinger D (1991) *Pflügers Arch* **418**: 519-521
54. Moule SK, McGivan JD (1990) *Biochim Biophys Acta* **1031**: 383-397
55. Vom Dahl S, Hallbrucker C, Lang F, Häussinger D (1991) *Biol Chem Hoppe-Seyler* **372**: 411-418
56. Bear CE (1990) *Am J Physiol* **258**: C421-C428
57. Bear CE, Petersen OH (1987) *Pflügers Arch* **410**: 342-344
58. Christensen O (1987) *Nature (Lond)* **330**: 66-68
59. Falke LC, Misler S (1989) *Proc Natl Acad Sci USA* **86**: 3919-3923
60. Sackin H (1987) *Am J Physiol* **253**: F1253-F1262
61. Henderson RM, Graf J, Boyer JL (1989) *Am J Physiol* **256**: G1028-G1035
62. Suzuki M, Kawahara K, Ogawa A, Morita T, Kawaguchi Y, Kurihara S, Sakai O (1990) *Am J Physiol* **258**: F690-F696
63. Baquet A, Hue L, Meijer L (1991) *FEBS Lett* **278**: 103-106
64. Vom Dahl S, Hallbrucker C, Lang F, Häussinger D (1991) *Eur J Biochem* **198**: 73-83
65. Paulmichl M, Friedrich F, Maly K, Lang F (1989) *Pflügers Arch* **413**: 456-462
66. Ahlberg J, Berkenstam A, Hennel F, Glaumann H (1985) *J Biol Chem* **260**: 5847-5854
67. Baquet A, Maisin L, Hue L (1991) *Biochem J* **278**: 887-890
68. Luiken JJFP, Blommaert EFC, Boon L, van Woerkom GM, Meijer A (1994) *Biochem Soc Trans* **22**: 508-511
69. Minton AP, Colclasure GC, Parker JC (1992) *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 10504-10506
70. Mortimore GE, Pösö AR (1987) *Annu Rev Nutr* **7**: 539-564
71. Schworer CM, Mortimore GE (1979) *Proc Natl Acad Sci USA* **76**: 3169-3173
72. Meijer A, Gustafson LA, Luiker JJFP, Blommaert PJE, Caro LHP, van Woerkom GM, Spronk C, Boon L (1993) *Eur J Biochem* **215**: 449-454
73. Theodoropoulos T, Gravanis A, Saridakis I, Stournaras C (1992) *FEBS Lett* **311**: 241-245
74. Häussinger D, Stoll B, vom Dahl S, Theodoropoulos T, Markogiannakis E, Gravanis A, Lang F, Stournaras C (1994) *Biochem Cell Biol* **72**: 12-19
75. Häussinger D, Newsome D, vom Dahl S, Stoll B, Schreiber R, Wettstein M, Lang F (1994) *Biochem Soc Trans* **22**: 499-504
76. Vom Dahl S, Stoll B, Gerok W, Häussinger D (1995) *Biochem J* **308**: 529-536
77. Lang F, Bush G, Völk H, Häussinger D (1994) *Biochem Soc Trans* **22**: 502-505
78. Weissbach L, Kilberg MS (1984) *J Cell Physiol* **121**: 133-138
79. Bode B, Kilberg MS (1991) *J Biol Chem* **266**: 7376-7381
80. Häussinger D, Lang W (1990) *J Cell Biochem* **43**: 355-361
81. Häussinger D, Stoll B, Morimoto Y, Lang F, Gerok W (1992) *Biol Chem Hoppe-Seyler* **373**: 723-734
82. Häussinger D, Lang F, Bauers K, Gerok W (1990) *Eur J Biochem* **193**: 891-898
83. Wettstein M, vom Dahl S, Lang F, Gerok W, Häussinger D (1990) *Biol Chem Hoppe-Seyler* **371**: 493-501
84. Graf J, Haddad P, Häussinger D, Lang F (1988) *Renal Physiol Biochem* **11**: 202-220
85. Meijer A, Baquet A, Gustafson L, van Woerkom G, Hue L (1992) *J Biol Chem* **267**: 5823-5828
86. Chen KS, Lardy HA (1985) *J Biol Chem* **260**: 14683-14688
87. Golden S, Wals PA, Okajima F, Katz J (1979) *Biochem J* **182**: 727-734
88. Katz J, Golden S, Wals PA (1976) *Proc Natl Acad Sci USA* **73**: 3433-3437
89. Katz J, Golden S, Wals PA (1979) *Biochem J* **180**: 389-402
90. Lavoigne A, Baquet A, Hue L (1987) *Biochem J* **248**: 429-437
91. Grant A, Tosh D, Burchell A (1992) *Biochem Soc Trans* **21**: 39S
92. Saha N, Stoll B, Lang F, Häussinger D (1992) *Eur J Biochem* **209**: 437-444
93. Hallbrucker C, Lang F, Gerok W, Häussinger D (1992) *Biochem J* **282**: 593-595
94. Häussinger D, Hallbrucker C, Saha N, Lang F, Gerok W (1992) *Biochem J* **288**: 681-689
95. Häussinger D, Saha N, Hallbrucker C, Lang F, Gerok W (1993) *Biochem J* **291**: 355-360
96. Boyer JL, Graf J, Meier PJ (1992) *Annu Rev Physiol* **54**: 415-438
97. Bruck RP, Haddad P, Graf J, Boyer JL (1992) *Am J Physiol* **262**: G806-G812
98. Lang F, Häussinger D (1993) W: Lang F, Häussinger D (red) *Advances in Comparative and Environmental Physiology*, t. 14. Springer-Verlag, Heidelberg
99. Jiang L-W, Maher VM, McCormick JJ, Schindler M (1990) *J Biol Chem* **265**: 4775-4777
100. Halestrap AP (1994) *Biochem Soc Trans* **22**: 522-529

# Fitochrom — struktura i właściwości

## Phytochrome structure and properties

ANDRZEJ TRETYN<sup>1</sup>,  
JUSTYNA WIŚNIEWSKA<sup>2</sup>

### Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Molekularne właściwości fitochromu
  - II-1. Budowa genów fitochromowych
    - II-1.1. Regulacja aktywności genów fitochromowych
  - II-2. Budowa fitochromu
    - II-2.1. Mechanizm fotokonwersji fitochromu
    - II-2.2. Fitochrom labilny i stabilny
- III. Molekularna ewolucja fitochromu

**Wykaz stosowanych skrótów:** P — fitochrom; Pr — forma fitochromu absorbująca światło czerwone (R); Pfr — forma fitochromu absorbująca światło dalekiej czerwieni (FR); phyA (PI) — fitochrom labilny; phyB (PII) — fitochrom stabilny; *PHYA* — gen fitochromu labilnego; *PHYB* — gen fitochromu stabilnego; *PHYA* — białkowy składnik fitochromu stabilnego; *PHYB* — białkowy składnik fitochromu stabilnego; Ptot — suma „steżeń” obu form fitochromu (Pr i Pfr) w warunkach równowagi; R — światło czerwone; FR — światło dalekiej czerwieni, tj. podczerwień.

### I. Wstęp

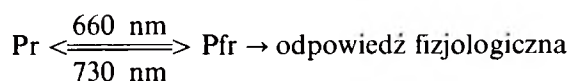
Światło odgrywa szczególną rolę w regulacji wzrostu i rozwoju roślin. Stanowi ono podstawowe źródło energii pozyskiwanej w procesie fotosyntezy. Ponadto dostarcza roślinom informacji o zmianach zachodzących w ich bezpośrednim otoczeniu. Sygnały świetlne odbierane są przez wyspecjalizowane fotoreceptory roślinne. Oprócz uczestniczących w fotosyntezie chlorofilów, karotenoidów i ksantofili, u roślin wykryto wiele innych barwników absorbujących światło o różnych długościach fal — od ultrafioletowego poprzez światło niebieskie, a na dalekiej czerwieni kończąc. Fotoreceptory te, nie uczestnicząc bezpośrednio w procesie fotosyntezy, odgrywają istotną rolę w regulowanej przez światło morfogenezie roślin. Na tej podstawie nazywane są barwnikami fotomorfogenetycznymi. Najlepiej poznanym wśród nich jest fitochrom; fotoreceptor absorbujący światło czerwone i daleką czerwień [1-4].

Fitochrom został wykryty na początku lat pięć-

### Contents:

- I. Introduction
- II. Molecular properties of phytochrome
  - II-1. Structure of phytochrome genes
    - II-1.1. Regulation of phytochrome gene activity
  - II-2. Structure of phytochrome
    - II-2.1. Mechanism of phytochrome photoconversion
    - II-2.2. Labile and stable phytochrome
- III. Molecular evolution of phytochrome

dziiesiątych przez Borthwicka, Hendricksa i w s p. [5]. Obecność tego fotoreceptora stwierdzono w tkankach przedstawicieli wszystkich roślin niższych i wyższych [1-2]. Fitochrom jest rozpuszczalną w wodzie chromoproteiną o charakterystycznym błękitnym zabarwieniu. Zbudowany jest z polipeptydu, którego masa w zależności od gatunku roślin waha się od 120-130 kD, połączonego z grupą chromoforową [6]. Barwnik ten występuje w dwóch formach molekularnych, różniących się między sobą właściwościami spektralnymi i funkcją biologiczną: Pr, która wykazuje maksimum absorpcji w zakresie światła czerwonego (R; ok. 660 nm) i Pfr — pochłaniającej światło dalekiej czerwieni (FR; ok. 730 nm). Naświetlając rośliny światłem o odpowiedniej długości fali można przekształcać jedną formę fitochromu w drugą;



Fotokonwersja Pr do Pfr powoduje wyzwalanie wielu odpowiedzi morfogenetycznych [7-8]. Powszechnie przyjmuje się, że jedynie Pfr jest aktywną formą fitochromu [3, 5]. Do pojawienia się odpowiedzi nie wystarcza powstanie aktywnej formy barwnika. Pochłonięciu światła przez Pr towarzyszy uruchomienie sekwencji przemian metabolicznych, zwanych również łańcuchem transdukcji sygnału, których zajście, w zależności od stanu kompetencji komórki, prowadzi do powstania adekwatnej odpowiedzi komórkowej [1-4, 7-8].

W wyniku traktowania roślin światłem w jej tkankach ustala się tzw. stan fotostacjonarny, charakteryzujący ilościowy stosunek obu form barwnika.

<sup>1</sup> Prof. dr hab., <sup>2</sup> mgr, Pracownia Izotopowa i Analizy Instrumentalnej oraz Zakład Fizjologii i Morfogenezy Roślin, Instytut Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Mikołaja Kopernika, ul. Gagarina 9, 87-100 Toruń

\* Praca powstała w trakcie realizacji Grantu 6-6068-92-03 finansowanego przez Komitet Badań Naukowych (KBN).

W etiolowanych siewkach owsa (jak również innych gatunków roślin) fitochrom występuje wyłącznie w formie Pr. W wyniku naświetlania tych siewek monochromatycznym światłem czerwonym 86% Pr przekształca się w Pfr. Natomiast monochromatyczna daleka czerwień przekształca prawie cały Pfr (ok. 99%) do Pr [1]. Ta właściwość fitochromu ma niezwykle ważne znaczenie ekologiczne. Hamujące wzrost roślin światło czerwone jest intensywniej pochłaniane przez wierzchnią warstwę liści (okap) niż światło podczerwone. Przy niskim stosunku R/FR w widmie świetlnym w roślinie inicjowane są procesy mające na celu przyspieszenie tempa jej wzrostu. W ten sposób zacięziony organizm może wyrastać ponad ograniczający dalszy jej rozwój okap i korzystać z pełnego zakresu widma słonecznego [7-8].

W zależności od dawki światła niezbędnej do zainicjowania określonej odpowiedzi fizjologicznej wyróżniono trzy typy reakcji kontrolowanych przez fitochrom. Oznaczone jako LFR (od ang. *Low Fluence Response*) reakcje nieskoenergetyczne indukowane są niskimi dawkami światła czerwonego (od 1 do 1000  $\mu\text{mol m}^{-2}$ ). Tego typu reakcje można nazywać klasycznymi gdyż efekt działania światła czerwonego znoszony jest w wyniku zastosowania po nim pulsu dalekiej czerwieni. Tej zależności nie wykazują natomiast reakcje bardzo niskoenergetyczne; VLFR (od ang. *Very Low Fluence Response*) oraz wysokoenergetyczne; HIR (od ang. *High Irradiance Response*) [1-3]. Do zainicjowania VLFR wystarczają minimalne dawki światła, w granicach od 0.0001 do 0.1  $\mu\text{mol m}^{-2}$ . Ten typ reakcji wywołać może światło gwiazd lub księżycy czy też pojedynczy błysk światła (np. nocna błyskawica). Reakcje typu HIR wywoływane są w wyniku długotrwałego działania na roślinę światłem o dużym natężeniu [1-2].

## II. Molekularne właściwości fitochromu

Pierwszych kilkadziesiąt lat jakie upłynęły od odkrycia fitochromu [5] poświęcono fizykochemicznej i biochemicznej analizie tego fotoreceptora. Opracowano metody pozwalające na izolowanie niezdegradowanej chromoproteiny [2]. Określono chemiczny charakter chromoforu [6]. W wyniku wprowadzenia przeciwciał poli- i monoklonalnych skierowanych przeciw fitochromowi określono jego wewnątrzkomórkową i tkankową lokalizację [2]. Krokiem milowym w badaniach nad tym fotoreceptorem było jednak sklonowanie genu fitochromowego i wydedukowanie na podstawie odpowiedniego cDNA pierwszorzędowej struktury jego białkowego składnika [3-5].

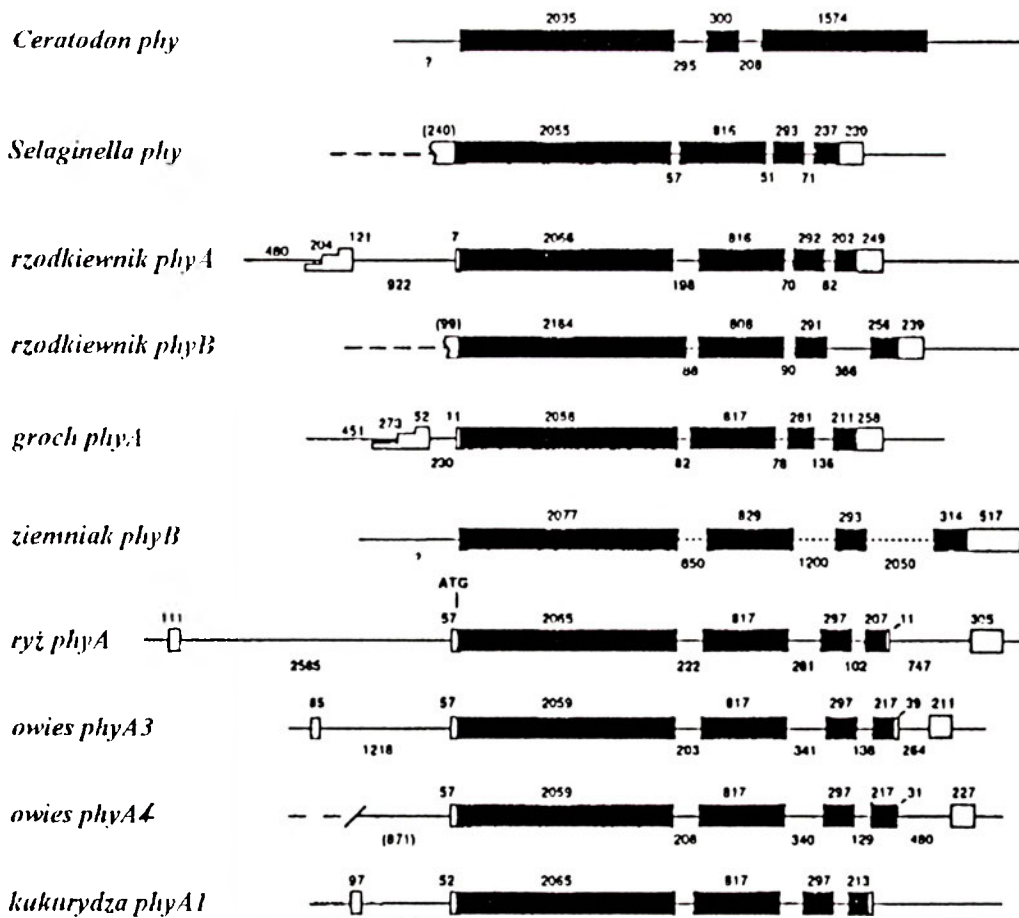
### II-1. Budowa genów fitochromowych

Budowę genu kodującego białkowy składnik fitochromu poznano u przedstawicieli kilkunastu gatunków roślin niższych i wyższych [2-3, 9-11]. Rośliny

okrytozalążkowe zawierają kilka rodzajów fitochromów kodowanych przez odmienne geny. Najlepiej pod tym względem poznanymi roślinami są rzodkiewnik (*Arabidopsis thaliana*) [2-3, 10, 12-13], pomidor, sorgo [2, 14] i owies [12]. U rzodkiewnika, pomidora i owsa występuje co najmniej 5 genów kodujących fitochrom. Z dostępnych danych wynika, że genom sorgo zawiera trzy, natomiast ryżu, tytoniu i ziemniaka co najmniej po dwa odmienne geny fitochromowe [2, 12]. U *Arabidopsis* zidentyfikowane geny oznaczono jako *PHYA*, *PHYB*, *PHYC*, *PHYD* i *PHYE* [10, 13]. Na podstawie wydedukowanego składu aminokwasowego ustalono, że największą homologię (ok. 80% identyczności) wykazują geny *PHYB* i *PHYD*. Stopień identyczności pomiędzy pozostałymi parami genów fitochromowych waha się w granicach od 46 do 55% [10, 12-13].

Ostatnio zsekwencjonowano pięć genów kodujących białkowy składnik fitochromu u pomidora, z których jeden jest bardzo podobny do genu *PHYA* rzodkiewnika. Dwa kolejne geny (oznaczone jako *PHYB1* i *PHYB2*) zbliżone są do genu *PHYB* wspomnianej rośliny. Natomiast dwa pozostałe (*PHYE* i *PHYF*) nie odpowiadają żadnemu z genów dotychczas przebadanych roślin [2, 14]. Z ostatnich badań prowadzonych w pracowni L. H. Pratta wynika, że u pomidora oprócz wymienionych pięciu może jeszcze funkcjonować od czterech do ośmiu dotąd niezidentyfikowanych genów fitochromowych, przy czym jeden z nich prawdopodobnie odpowiada genowi *PHYC* rzodkiewnika [2, 14]. We wspomnianej pracowni wykazano również, że geny fitochromowe u sorgo są odpowiednikami *PHYA*, *PHYB* i *PHYC* *Arabidopsis* [2]. Pełne sekwencje genów fitochromowych poznano również dla niektórych mszaków (*Ceratodon*, *Physcomitrella*) i paprotników (*Psilotum*, *Adiantum*, *Selaginella*) [11, 15-16]. Ponadto częściowo zsekwencjonowano geny kodujące cząsteczki fitochromu u glonów (*Mougeotia*, *Mesotaenium*), mchów, skrzypów, paproci, miłorzębu (*Ginkgo biloba*) i sosny [16-18].

Większość dotąd poznanych genów fitochromowych swą strukturą i składem nukleotydów przypominają geny *PHYA* i *PHYB* u *Arabidopsis*. Rycina 1 przedstawia strukturę kilku znanych genów fitochromowych [12]. Porównując dostępne dane ustalono, że z wyjątkiem mchu *Ceratodon* [11] struktura znanych genów fitochromowych jest bardzo podobna. Liczba i wielkość eksonów u pozostałych gatunków roślin jest także bardzo podobna. Zmiany są wynikiem obecności dodatkowych sekwencji intronowych od końca 3' (np. u ryżu i owsa oraz prawdopodobnie u kukurydzy), których znaczenie jest nadal nieokreślone [12]. Intrygująca jest odmienna struktura sekwencji genu *PHY* u mchu *Ceratodon* [11]. Długi ekson końca 5' i krótki (ok. 100 pz) odcinek środkowego eksonu posiadają sekwencje odpowiadające regionom innych genów fitochromowych. Natomiast duży ekson końca 3' zawiera odcinek kodujący 530 reszty aminokwasowe, który nie wykazuje homologii z innymi



Ryc. 1 Schemat przedstawia budowę genów fitochromu u przedstawicieli różnych gatunków roślin. Linia ciągłą oznaczone są introny, prostokątami zaś eksony (niezamalowane — sekwencje nie podlegające translacji; zamalowane — sekwencje podlegające translacji). Linia przerywaną zaznaczono odcinki niezsekwencjonowane. (Na podstawie [12] — zmodyfikowane).

dotąd poznanymi genami *PHY*. W skład wspomnianego regionu wchodzi między innymi odcinek DNA kodujący około 300-aminokwasowe białko, o sekwencji uderzająco podobnej do katalitycznej domeny eukariotycznych kinaz białkowych [11]. Ostatnio stwierdzono, że sekwencje zbliżone do histydynowych kinaz białkowych obecne są również w cząsteczkach większości poznanych fitochromów [19].

O występowaniu co najmniej pięciu kopii genu *PHY* u paprotnika *Psilotum* doniósł ostatnio Schneider-Poetsch i wsp. [16]. Na podstawie porównywania sekwencji aminokwasów wydedukowanych z analizowanych cDNA ustalono, że poszczególne geny różnią się między sobą jedynie w niewielkim stopniu: od 4.7 do 22.6%. Uwzględniając niezwykle dużą liczbę chromosomów w komórkach *Psilotum* przypuszcza się, że zawierają one jeszcze większą niż dotąd ustalono liczbę genów fitochromowych. Analiza otrzymanych klonów wykazała, że pewna ich część posiada strukturę molekularną znacznie odbiegającą od znanych genów *PHY*. Na tej podstawie przypuszcza się, że część genów fitochromowych *Psilotum* jest jedynie pseudogenami, nie wykazującymi aktywności transkrypcyjnej [16].

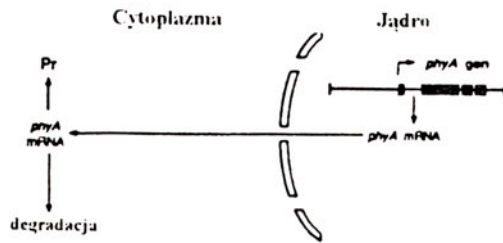
### II-1.1. Regulacja aktywności genów fitochromowych

Zarówno światło, jak i cząsteczki aktywnej formy fitochromu (Pfr) regulują tempo syntezy i degradacji fotoreceptora. Aktualny poziom barwnika w komórkach jest wypadkową trzech procesów: 1) tempa transkrypcji, 2) czasu (pół) trwania fitochromowego mRNA oraz 3) tempa degradacji apoproteiny [12, 20]. Rycina 2 ilustruje przypuszczalny mechanizm regulacji aktywności transkrypcyjnej genu *PHYA* u owsa (patrz powyżej).

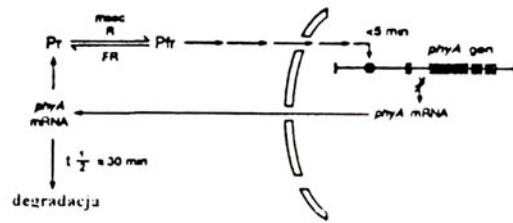
W tkankach roślin rosnących w ciemności gen *PHYA* podlega pełnej ekspresji. W wyniku procesów transkrypcji i translacji dochodzi do stałej produkcji białkowego składnika fitochromu, który łącząc się z grupą chromoforową tworzy funkcjonalne cząsteczki fotoreceptora. Po okresie wzrostu zawartość fitochromu ustala się na wysokim, stałym poziomie wynikającym ze zrównoważenia tempa syntezy i degradacji cząsteczek barwnika (Ryc. 2a).

W ciemności fitochrom syntetyzowany jest w formie Pr, która podlega akumulacji na terenie cytoplazmy podstawowej [1-3]. Naświetlaniu etiolowanych siewek owsa światłem czerwonym towarzyszy szybkie obniżanie poziomu fitochromowego mRNA oraz skrócenie czasu jego półtrwania. Efekt działania czerwieni można częściowo lub całkowicie odwrócić naświetlając rośliny daleką czerwienią. Ekspozycja etiolowanych roślin na światło uruchamia (w ciągu milisekund)

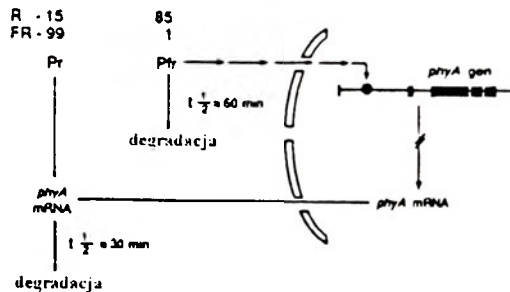
## a) CIEMNOŚĆ



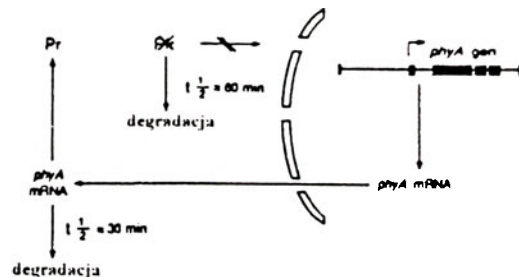
## b) ŚWIATŁO



## c) ŚWIATŁO -----&gt; ciemność



## d) ŚWIATŁO -----&gt; ciemność



Ryc. 2 Schemat przedstawiający fitochromową regulację ekspresji genu *PHYA* owsa — patrz dokładny opis w tekście. (Na podstawie [9] — zmodyfikowane).

fotokonwersję Pr do Pfr, która po upływie 2-5 minut inicjuje mechanizm represji transkrypcyjnej genu fitochromowego (Ryc. 2b). Prowadzi to (w ciągu 30 minut) do zahamowania syntezy odpowiedniego mRNA. Ponadto, powstały tą drogą Pfr jest bardziej wrażliwy na zależną od ubikwiny degradację białkowego składnika fotoreceptora [20]. Kiedy hodowane na świetle siewki owsa przeniesione zostaną do ciemności, po pewnym okresie czasu dochodzi do odblokowania genu fitochromowego. Proces ten obserwuje się od momentu kiedy pozostała pula Pfr spadnie poniżej pewnego, krytycznego poziomu, wyznaczanego głównie tempem degradacji tej formy fitochromu (czas półtrwania Pfr wynosi około 60 minut). Światło czerwone powoduje powstawanie dużej ilości Pfr (85 relatywnych jednostek), która blokuje gen fitochromowy przez okres dłuższy od 12 godzin. Daleka czerwień zastosowana po świetle czerwonym powoduje spadek liczebności aktywnej formy fitochromu (do ok. 1 relatywnej jednostki), indukując derepresję omawianego genu w czasie krótszym od 3 godzin (Ryc. 2c). W przypadku gdy rośliny są dłużej przetrzymywane w ciemności wówczas zawartość Pfr spada poniżej krytycznego poziomu co prowadzi do stopniowej aktywacji genu *PHYA*, akumulacji mRNA i syntezy fitochromu w formie Pr (Ryc. 2d) [12].

Przypuszcza się, że poza opisanym istnieją jeszcze inne mechanizmy kontroli aktywności transkrypcyjnej genów fitochromowych. W genomie roślin jednoliściennych występować może kilka kopii genu *PHYA*. U owsa jest ich aż 5, natomiast u ryżu i kukurydzy po

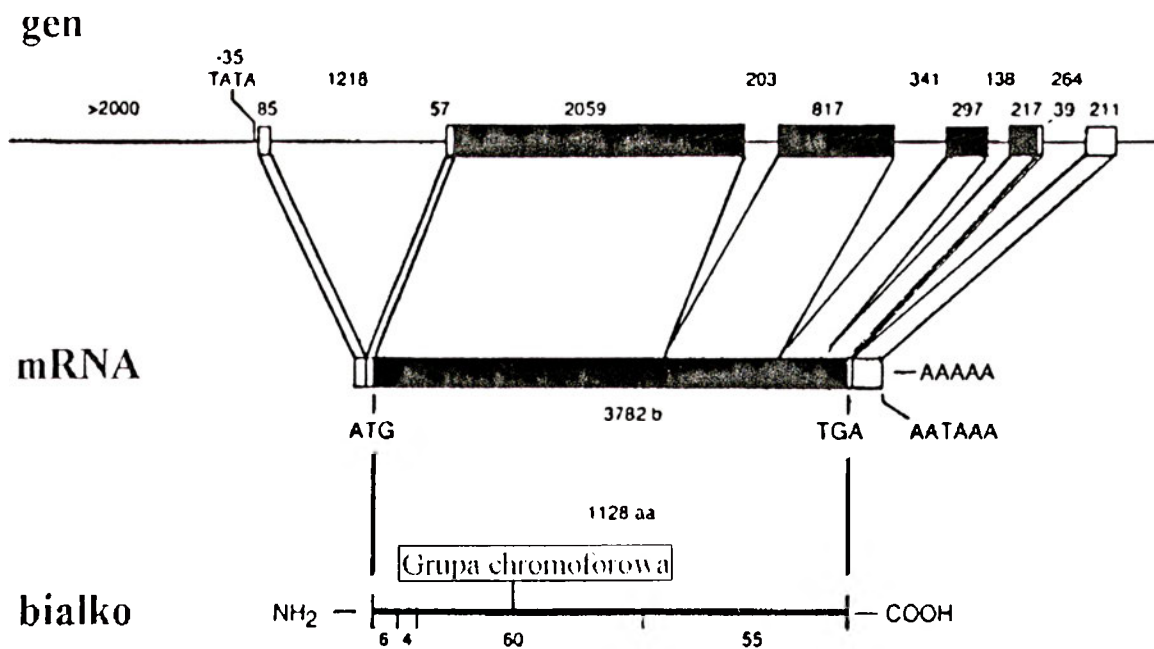
2 [1-3]. W zależności od warunków świetlnych wspomniane geny podlegają zróżnicowanej aktywacji [12].

Choć z roślin dwuliściennych występują tylko pojedyncze kopie *PHYA*, to jednak na ich matrycy powstawać może kilka, różniących się długością transkryptów (mRNA). Na bazie *PHYA* rzodkiewnika powstają trzy typy transkryptów (mRNA1-mRNA3), różniące się długością 5'-końcowego, niepodlegającego translacji odcinka RNA. Najobficiej transkrybowany jest najkrótszy z nich (mRNA3), a w najmniejszym stopniu najdłuższy (mRNA1) [21]. Poza rzodkiewnikiem również u grochu stwierdzono występowanie trzech odmiennych transkryptów powstających na bazie tego samego *PHYA*. Wydaje się, że synteza określonego transkryptu regulowana jest przez cząsteczkę aktywnej formy fitochromu (Pfr) w odpowiedzi na warunki świetlne panujące w środowisku. W grochu jedynie poziom mRNA1 kontrolowana jest przez światło. Natomiast mRNA2 i mRNA3 są transkrybowane (w znacznie mniejszym stopniu) bez względu na warunki świetlne [21].

## II-2. Budowa fitochromu

Od kilku lat znana jest szczegółowa budowa genu, oraz powstającego na jego bazie transkryptu i pełna sekwencja białkowego składnika fitochromu owsa [1, 9].

Gen *PHYA3* owsa zbudowany jest z 5,94 kbp i składa się z 6 eksonów i 5 intronów. Transkrypcja mRNA rozpoczyna się od tandemowej sekwencji TATA, leżącej w promotorowym odcinku genu (Ryc.



Ryc. 3 Schemat przedstawiający budowę genu *PHYA3* fitochromu owsa, dojrzałego transkryptu oraz produkt translacji z przyłączoną grupą chromoforową. Gen: eksony oznaczono jako prostokąty (niewypełnione — nie podlegające translacji; wypełnione — podlegające translacji), introny ilustruje linia prosta. Nad każdym odcinkiem zaznaczono ilość par zasad (patrz dokładny opis w tekście). (Na podstawie [4] — zmodyfikowane).

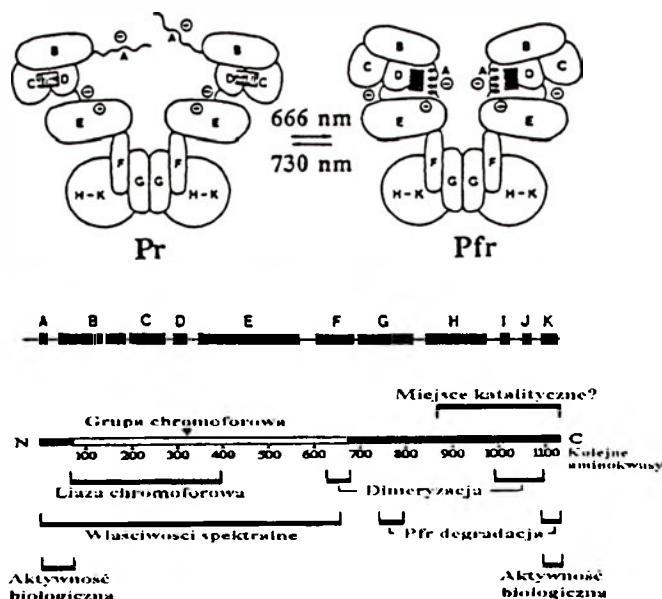
3). Dojrzały, powstały w wyniku transkrypcji mRNA zbudowany jest z 3,78 kpz (łącznie z 3'-końcową sekwencją poli-A). Pierwszy (142 pz) i ostatni (252 pz) odcinek mRNA nie podlegają translacji zaś centralny fragment liczący 3387 pz zawiera sekwencje kodujące białko. Dojrzały mRNA posiada kodon inicjujący (ATG) i kończący (TGA) transkrypcję [9, 12]. Powstające na bazie opisanego mRNA białko fitochromu składa się z 1128 aminokwasów (124 kDa). W wyniku postranslacyjnej obróbki do jego 321-wszej reszty aminokwasowej (cysteiny) polipeptydu, poprzez wiązanie kowalencyjne przyłączona zostaje, osobno syntetyzowana grupa chromoforowa. Po przyłączeniu chromoforu do polipeptydu powstają funkcjonalne cząsteczki fitochromu [6].

Polipeptyd fitochromu owsa podzielić można na dwa odcinki: N-końcową (około 74 kDa), globularną domenę zawierającą grupę chromoforową oraz krótszy fragment C-końcowy (55 kDa) (Ryc. 3 i 4). N-końcowa domena odpowiada w przybliżeniu pierwszemu (dużemu) eksonowi, zaś C-końcowy fragment białka fitochromu kodowany jest przez trzy kolejne eksony (Ryc. 3). Globularna domena N-końcowa wiąże grupę chromoforową i odpowiada za spektralne właściwości fitochromu [6].

Fitochrom wyizolowany z etiolowanych siewek owsa występuje w formie homodimeru. Dwie 124 kDa cząsteczki tego fotoreceptora łącząc się wiązaniami jonowymi i siłami elektrostatycznymi tworzą dimer o masie molowej rzędu 253 kDa [6, 12]. Jak wykazano, proces dimeryzacji odbywa się w wyniku oddziaływań zachodzących pomiędzy C-końcowymi domenami poszczególnych polipeptydów fitochromu (Ryc. 4). Cząsteczki fotoreceptora wchodzące w skład dimeru są ze

sobą luźno związane i łatwo dysocjują pod wpływem roztworów o dużej sile jonowej [22]. Podczas dysocjacji dimeru nie obserwuje się zmian widma czynnościowego poszczególnych cząsteczek fitochromu [6].

Analizując strukturę pierwszorzędową cząsteczek fitochromu owsa (*phyA*) wykryto, że w C-końcowej części polipeptydu występują dwie sekwencje aminokwasowe (V623-S673 oraz N1049-Q1129), tworzące cztery segmenty o konfiguracjach charakterystycznych dla domen odpowiedzialnych za oddziaływanie typu



Ryc. 4 Domenowa budowa fitochromu owsa. W skład fragmentu N-końcowego (zawierającego grupę chromoforową) wchodzi regiony A-E, domena C-końcowa zbudowana jest z odcinków G-K, natomiast rejon łącznikowy oznaczony jako F. Grupę chromoforową ilustruje prostokąt. (Na podstawie [6] — zmodyfikowane).

białko-białko. Obecność dwóch z czterech wymienionych sekwencji stwierdzono również w cząsteczkach fitochromu typu A, B i C innych gatunków roślin. Na tej podstawie przypuszcza się, że wspomniane domeny uczestniczą w procesie dimeryzacji różnych typów fitochromu. Może to prowadzić do powstawania kilku typów homo- i heterodimerów (np. phyA-phyA; phyA-phyB; phyA-phyC, itd) [23]. Pozostałe dwie domeny mogą natomiast odpowiadać za oddziaływania fitochromu z białkami docelowymi; np. różnego typu enzymami związanymi ze szlakami transdukcji sygnałów [23].

Cząsteczki fitochromu A są bardzo do siebie podobne pod względem budowy molekularnej. W ich skład, w zależności od gatunku rośliny wchodzi od 1122 do 1131 reszt aminokwasowych. Stopień identyczności składu aminokwasowego cząsteczek phyA różnych gatunków roślin sięga 65-90%. Obecnie wiadomo, że u rzodkiewnika cząsteczki phyB zbudowane są z polipeptydu składającego się z 1172, natomiast phyC ze 1111 reszt aminokwasowych. Oba te fitochromy wykazują jedynie 50% identyczności składu aminokwasów względem siebie i w stosunku do phyA [5, 13].

## II-2.1. Mechanizm fotokonwersji fitochromu

Absorbencji światła przez fitochrom towarzyszy izomeryzacja jego grupy chromoforowej, inicjująca konformacyjne zmiany w białkowym składniku fotoreceptora [6]. U owsa natychmiast po pochłonięciu światła przez grupę chromoforową następuje jej fotoizomeryzacja i rotacja względem łańcucha polipeptydowego oraz przemieszczenie się N-końcowego odcinka polipeptydu w głąb cząsteczki fitochromu (Ryc. 4). Krótka, zbudowana z hydrofilnych aminokwasów, 6 kD N-końcowa domena (na Ryc. 4 zaznaczona jako region A) fitochromu odpowiada za współdziałanie białkowego i chromoforowego składnika fotoreceptora [6]. Przypuszcza się, że ten powierzchniowy fragment cząsteczki Pr ochrania grupę chromoforową przed zewnętrznym środowiskiem wodnym [1, 6, 9].

## II-2.2. Fitochrom labilny i stabilny

U roślin etiolowanych fitochrom syntetyzowany jest i akumulowany w formie Pr. Ta bardzo stabilna w ciemności forma fotoreceptora po naświetleniu rośliny światłem czerwonym przekształca się w podlegającą szybkiej destrukcji formę Pfr. Obok niej, u roślin rosnących na świetle występuje druga frakcja Pfr — oporna na degradację [1, 12, 20]. Na podstawie tych obserwacji wyróżniono dwie fizjologiczne pule fitochromu: labilną i stabilną. Badania nad strukturą i ekspresją genów fitochromowych u *Arabidopsis thaliana* wykazały, że fitochrom labilny i stabilny kodowany jest przez odmienne geny. Tylko jeden z 5 genów fitochromowych zidentyfikowanych u rzodkiewnika (oznaczony jako *PHYA*) koduje cząsteczki fitochromu

labilnego. Cztery inne (*PHYB-PHYE*) odpowiadają za powstawanie cząsteczek fitochromu stabilnego [12-13]. Produkty wymienionych genów oznaczono jako fitochrom A, B, C, D i E [9]. Tabela 1 przedstawia wzajemne stosunki liczebności mRNA kodujących cząsteczki wymienionych typów fitochromu w tkankach siewek *Arabidopsis* wyrosłych w ciemności i traktowanych światłem czerwonym [12-13].

Poza rzodkiewnikiem również u pomidora stwierdzono występowanie dwóch frakcji Pfr; odpornej

**Tabela 1.**

Względny poziom mRNA kodującego 5 rodzajów fitochromu (phyA-phyE) w siewkach *Arabidopsis thaliana* wyrosłych w ciemności lub traktowanych światłem czerwonym. Poziom *PHYC* mRNA przyjmowano za 1. (Na podstawie [9,12-13]).

Rodzaj fitochromu	Ciemność	Światło czerwone
phyA	500	5
phyB	10	10
phyC	1	1
phyD	> 1	> 1
phyE	> 1	> 1

i nieodpornej na działanie światła. W tkankach pomidora odkryto obecność mRNA, kodującego pięć odmiennych rodzajów fitochromu. Tylko w przypadku jednego z fitochromów żywotność kodującego go mRNA regulowana jest przez światło. Poziom mRNA dla czterech pozostałych typów fitochromu nie podlegał tak ścisłej kontroli (Tab. 2).

Prawie wszystkie dotąd poznane geny fitochromowe wykazują podobieństwo strukturalne do genów *PHYA* i *PHYB* *Arabidopsis* (Ryc. 1) [2, 12-13]. Na tej podstawie zaproponowano, że fitochrom labilny (PI), kodowany u roślin przez geny o strukturze zbliżonej do *PHYA* rzodkiewnika oznaczać jako fitochrom A (phyA lub PrA i PfrA), natomiast fitochrom stabilny (PII) określać jako fitochrom B (phyB lub PrB i PfrB), fitochrom C, itd. [12].

Somers i Quail [24] opisali ostatnio wzorzec ekspresji genów kodujących cząsteczki fitochromu labilnego (phyA) i stabilnego (phyB) w różnych narządach i fazach rozwojowych *Arabidopsis*. W tym celu

**Tabela 2.**

Bezwzględny poziom (mol/g suchej masy) mRNA kodującego różne rodzaje fitochromu w tkankach etiolowanych oraz zielonych pomidorów o różnym wieku osobniczym (5 lub 56 dni). (Na podstawie [2], zmodyfikowane).

Rodzaj fitochromu	5-dniowe, etiolowane	5-dniowe, zielone	56-dniowe, zielone
phyA	5000	800	200
phyB1	80	300	80
phyB2	300	100	70
phyE	50	30	90
phyF	10	10	4
Suma (A-F)	5440	1240	444



sekwencje promotorowe obu genów połączono z sekwencjami kodującymi genu reporterowego GUS ( $\beta$ -glukuronidazy), wprowadzono je za pomocą *Agrobacterium* do komórek rzodkiewnika. Aktywność enzymatyczną w transformowanych roślinach określano przy pomocy odpowiedniej metody histochemicznej. Na tej podstawie wnioskowano zarówno o komórkowej i tkankowej lokalizacji określonego genu fitochromowego oraz o sposobie jego kontroli i poziomie aktywności transkrypcyjnej [24]. Przy pomocy opisanej techniki wykazano, że w suchych nasionach rzodkiewnika *PHYA-GUS* transkrybowany jest głównie w korzonku zarodkowym, natomiast *PHYA-GUS* w liścieniach i pozostałych częściach zarodka [24]. Po dwóch dniach wzrostu siewek w ciemności zaobserwowano ponad 25-krotny wzrost poziomu aktywności transkrypcyjnej *PHYA-GUS* przy stosunkowo stałym poziomie *PHYB-GUS*. Podobną sytuację obserwowano w siedmiodniowych, etiolowanych siewkach rzodkiewnika. Analizując ekspresję obu chimericznych genów w liścieniach stwierdzono, że *PHYB-GUS* wykazuje podwyższoną aktywność w komórkach epidermalnych, podczas gdy *PHYA-GUS* wykazywał równomierny poziom ekspresji w komórkach mezofilu [24]. Po przeniesieniu siewek na światło obserwowano szybki spadek aktywności transkrypcyjnej *PHYA-GUS*.

Wyniki wyżej opisanych doświadczeń wskazują, że choć oba typy fitochromów (labilny i stabilny) występują w tych samych komórkach lub tkankach, to poziom aktywności transkrypcyjnej kodujących je genów zmienia się w zależności od fazy rozwojowej rośliny i od warunków świetlnych otoczenia.

### III. Molekularna ewolucja fitochromu

W większości dotąd przebadanych roślin niższych stwierdzono obecność pojedynczego genu fitochromowego. Natomiast u roślin wyższych funkcjonują dwa lub kilka genów kodujących białkowych składnik tego fotoreceptora. W związku z tym przypuszcza się, że wszystkie geny fitochromowe wywodzą się od prapenu, który w trakcie ewolucji podlegał procesowi duplikacji.

Na podstawie podobieństwa istniejącego pomiędzy grupą chromoforową fitochromu a fikocjanin, barwników występującym w komórkach sinic sugeruje się, że „narodziny” genu fitochromowego nastąpiły u tych prymitywnych organizmów prokariotycznych. W wyniku duplikacji wspomnianego prapenu mogło dojść do wyodrębnienia dwóch odmiennych typów genu (zbliżonych do *PHYA* i *PHYB Arabidopsis*), które poprzez kolejne duplikacje dały początek całej rodzinie genów fitochromowych. Jak już zaznaczono powyżej znaczna część roślin niższych posiada pojedynczy gen fitochromowy. U *Physcomitrella patens* (mech), *Psilotum nudum* (paproć) i *Selaginella martensii* (paproć różnazarodnikowa) gen ten koduje białkowy składnik

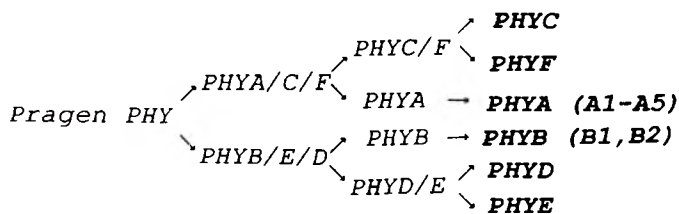
fitochromu wykazujący podobieństwo zarówno do *PHYA*, jak i do *PHYB* roślin wyższych [16]. Krótki, N-końcowy fragment (~ aa 90-230) polipeptydu homologiczny jest z podobną domeną fitochromu typu A (*phyA*). Natomiast odcinek zawierający reszty aminokwasowe graniczące z miejscem przyłączania chromoforu (~ aa 250-450) wykazuje wysoki stopień homologii w stosunku do adekwatnego fragmentu *PHYB* [16]. Obecny u paprotników gen fitochromowy najprawdopodobniej uległ duplikacji dając tym samym początek fitochromowi typu A i B. Do wspomnianej duplikacji musiało dojść jeszcze przed powstaniem pierwszych roślin nasiennych. Ponieważ zarówno rośliny dwu- i jednoliścienne posiadają odpowiedniki genów *PHYA*, *PHYB* oraz *PHYC*, to druga z możliwych duplikacji nastąpiła przed podziałem okrytozależnych na dwie wyżej wymienione grupy taksonomiczne [2]. Od tego momentu ewolucja genów fitochromowych miała inny przebieg u roślin jedno- i dwuliściennych. U tych pierwszych szybszej ewolucji podlegał *PHYA*. W wyniku jego kolejnych duplikacji dochodziło do powstawania kolejnych kopii tego genu. Tak zapewne można tłumaczyć obecność pięciu genów typu *PHYA* u owsa [9]. U roślin dwuliściennych duplikacje dotyczyły głównie genów *PHYB* i *PHYC*, które dały początek genom *PHYB* i *PHYD* u rzodkiewnika oraz *PHYB1*, *PHYB2*, *PHYC* i *PHYF* pomidora (Ryc. 5A) [2].

Nie wszystkie duplikacje prowadziły do powstawania funkcjonalnych genów fitochromowych. Przykładowo, u grochu i kukurydzy stwierdzono występowanie „skróconych”, niefunkcjonalnych genów *PHYA*. Obecność tego typu pseudogenów stwierdzono również w genomach innych gatunków roślin [2, 16].

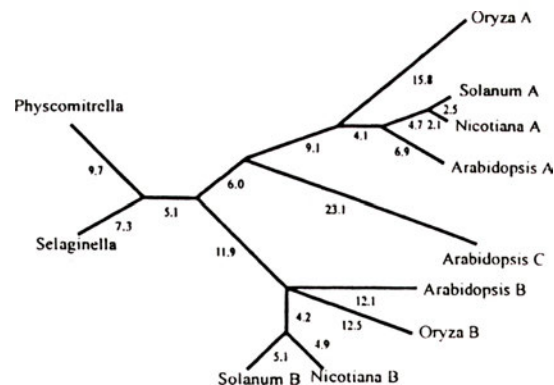
Tempo ewolucji genów fitochromowych u roślin nasiennych było dużo szybsze w porównaniu do roślin zarodnikowych [16]. Filogenetyczny dystans pomiędzy fitochromem *Selaginella martensii* i *Physcomitrella patens* (17), których przodkowie odseparowali się od siebie około 450 milionów lat (Myr) temu, jest dużo mniejszy od dystansu istniejącego pomiędzy fitochromami typu A, B i C roślin okrytonasiennych (np. dla fitochromu typu A i B u ryżu wynosi on prawie 57) (Ryc. 5B). Fitochrom roślin nasiennych ewoluował również znacznie szybciej (około 10 razy) w porównaniu do innych białek, takich jak duża podjednostka karboksylazy rybulozo-1,5-bisfosforanowej — kluczowy enzym ciemnej fazy fotosyntezy.

Ewolucja fitochromu mogła również mieć swoje „ślepe uliczki”. Jak wykazano ostatnio, poza roślinami również u pewnych grzybów światło o widmie czynnościowym zbliżonym do fitochromu indukuje szereg odpowiedzi fizjologicznych. U *Aspergillus nidulans* czerwień (ok. 680 nm) stymuluje, natomiast zastosowana po nim daleka czerwień (ok. 730 nm) hamuje wytwarzanie zarodników konidialnych. Griffith i w.s.p. [25] wyselekcjonowali mutantą (*brlA*) niewrażliwego na działanie obu wymienionych długości

A



B



Ryc. 5 Ewolucja genów fitochromowych. A) Przewidywany przebieg kolejnych duplikacji prągu fitochromowego. B) Drzewko filogenetyczne ilustrujące ewolucję genu fitochromowego u roślin lądowych. (Na podstawie [2] i [16], zmodyfikowane).

fał. Gen, w którym zaszła mutacja zsekwencjonowano, a następnie ustalono pierwszorzędową strukturę kodowanego na jego matrycy białka. Ustalono, że białko BRLA zbudowane jest ze 432 reszt aminokwasowych. W skład jego domeny C-końcowej wchodzi dwa palce cynkowe; sekwencje występujące w polipeptydach posiadających zdolność bezpośredniego oddziaływania z DNA. Domena N-końcowa zaś wykazywała stosunkowo dużą homologię w stosunku do cząsteczek fitochromu labilnego (phyA). Jednakże w białku BRLA nie wykryto obecności odpowiedniej reszty cysteinowej, która podobnie jak w przypadku fitochromu mogłaby uczestniczyć w wiązaniu odpowiedniej grupy chromoforowej. Ponadto BRLA nie zawiera silnie konserwatywnych sekwencji aminokwasowych bezpośrednio sąsiadujących ze wspomnianą resztą cysteinową. Na tej podstawie przypuszcza się, że N-końcowy fragment BRLA może oddziaływać z peptydem zdolnym do absorpcji światła czerwonego i dalekiej czerwieni. Można przypuszczać, że BRLA przedostaje się do jądra komórkowego, gdzie oddziałując poprzez palce cynkowe z odpowiednim odcinkiem DNA działa jako aktywator transkrypcji określonego genu, kontrolującego proces wytwarzania zarodników [25].

Artykuł otrzymano 20 czerwca 1995 r.

Zaakceptowano do druku 9 listopada 1995 r.

## Piśmiennictwo

- Tretyn A (1992) W: *Fitochrom i Morfogeneza Roślin*. Kopcewicz J., Tretyn A., Cymerski M. PWN, Warszawa, str. 58-107
- Pratt LH (1992) *Photochem Photobiol* 61: 10-21
- Quail PH (1994) *Cur Opin Genet Develop* 4: 652-661
- Borthwick HA, Hendrics SB, Parker MW (1952) *Proc Natl Acad Sci USA* 38: 929-934
- Elich TD, Chory J (1994) *Plant Molec Biol* 26: 1315-1327
- Furuya M, Song P-S (1994) W: *Photomorphogenesis in Plants*, red. Kendrick RE, Kronenberg GHM. Kluwer Acad Publ, Dordrecht, str. 105-140
- Kopcewicz J, Tretyn A, Cymerski M (1992) W: *Fitochrom i Morfogeneza Roślin*. PWN, Warszawa
- Kendrick RE, Kronenberg GHM (1994) W: *Photomorphogenesis in Plants*. Kluwer Acad Publ, Dordrecht, The Netherlands
- Quail PH, Gatz C, Hershey HP, Jones AM, Lissemore J-L, Parks BM, Sharrock RA, Barker RF, Idler K, Murray MG, Koornneef M, Kendrick RE (1989) W: *Phytochrome and Photoregulation in Plants*, Red. M. Furuya, Academic Press Inc., Tokio, str. 23-37
- Sharrock RA, Quail PH (1989) *Genes Dev* 3: 1745-1757
- Tümmler F, Beetz A, Rüdiger W (1990) *FEBS Lett* 275: 125-129
- Quail PH (1994) W: *Photomorphogenesis in Plants*, red. Kendrick RE, Kronenberg GHM Kluwer Acad. Publ., Dordrecht, str. 71-104
- Clack T, Mathews S, Sharrock RA (1994) *Plant Mol Biol* 25: 413-427
- Hauser B, Cordonnier-Pratt M-M, Pratt LH (1994) *Plant Physiol* 105: 72
- Hanelt S, Braun B, Marx S, Schneider-Poetsch HA W (1992) *Photochem Photobiol* 56: 751-758
- Schneider-Poetsch HA W, Marx S, Kolukisaoglu HU, Hanelt S, Braun B (1994) *Physiol Plant* 91: 241-250
- Mathews S, Lavin M, Sharrock A (1995) *Ann Mo Bot Gard* w druku
- Kolukisaoglu HU, Marx S, Wiegmann C, Hanelt S, Schneider-Poetsch HA W (1995) *J Mol Evol* w druku
- Thümmler F, Algarra P, Fobo GM (1995) *FEBS Lett* 357: 149-155
- Vierstra RD (1994) W: *Photomorphogenesis in Plants*, red. Kendrick RE, Kronenberg GHM. Kluwer Acad Publ Dordrecht, str. 141-160
- Dehesh K, Franci C, Sharrock RA, Somers D, Welsch JA, Quail PH (1994) *Photochem Photobiol* 59: 379-384
- Jones AM, Quail PH (1986) *Biochemistry* 25: 2987-2995
- Edgerton MD, Jones AM (1992) *Plant Cell* 4: 161-171
- Somers DE, Quail PH (1995) *Plant J* 7: 413-427
- Griffith GH, Jenkins GI, Miler-White JE, Clutterbuck AJ (1994) *Photochem Photobiol* 59: 252-256

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.

# Etylen — jego udział w regulacji dojrzewania owoców i starzenia się kwiatów. Aspekty biotechnologiczne

## Ethylene. Its role in the ripening and senescing processes of fruits and flowers. The biotechnological aspects

MAŁGORZATA JAKUBOWICZ\*

### Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Biosynteza etylenu w roślinach wyższych
- III. Udział etylenu w regulacji procesu dojrzewania owoców i starzenia się kwiatów
- IV. Udział etylenu w procesie degeneracji systemów błonowych w czasie starzenia się komórki roślinnej
- V. Biotechnologiczne aspekty badań nad szlakiem biosyntezy etylenu

### Contents:

- I. Introduction
- II. Ethylene biosynthetic pathway in higher plants
- III. Role of ethylene during the ripening and senescing of fruits and flowers
- IV. Problem of ethylene action in the membrane deterioration processes during senescing plant cells
- V. The biotechnological aspects of studies on the ethylene biosynthetic pathway

### I. Wstęp

Etylen, prosty węglowodór z grupy olefin jest ważnym fitohormonem uczestniczącym w regulacji procesów fizjologicznych w roślinach wyższych. Bierze on udział w regulacji takich zjawisk jak dojrzewanie owoców, starzenie się kwiatów, kiełkowanie nasion, opadanie liści, wzrost korzeni itp [1]. Rośliny wytwarzają etylen również w odpowiedzi na różnorodne czynniki stresowe np. zranienie, zmiany temperatury, dehydratację, infekcję patogenem itp. [1].

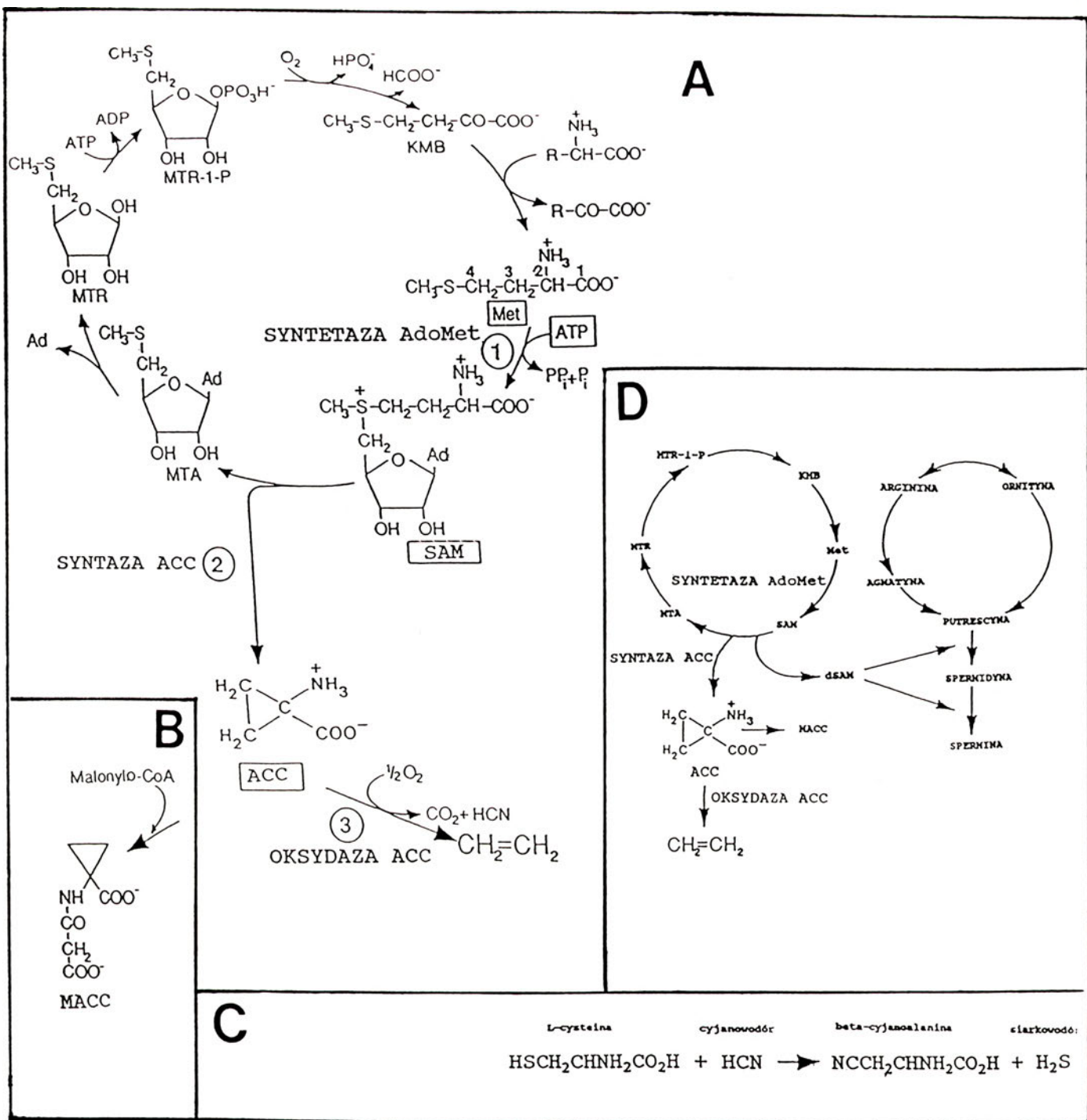
W pracy nie zajmuję się biosyntezą etylenu indukowaną stresami, nie analizuję zależności między etylenem a innymi fitohormonami, wskazuję na rolę etylenu jako regulatora i przyspieszacza dojrzewania oraz starzenia się klimakterycznych owoców i kwiatów.

### II. Biosynteza etylenu w roślinach wyższych

Szlak biosyntezy etylenu w dojrzewających owocach wyjaśniony został przez Y a n g a, H o f f m a n a i A d a m s a [1, 2]. Udowodnili oni, że w roślinach wyższych prekursorem etylenu jest metionina. Jej trzeci i czwarty węgiel wchodzi w skład etylenu. W czasie dojrzewania owoców biosynteza etylenu związana jest z cyklicznymi przekształceniami pochodnych powstałych z S-adenozylometioniny, przemiany te są określane jako cykl Yanga. Cykl ten umożliwia intensywną produkcję etylenu bez wysokiego wewnątrzkomórkowego stężenia metioniny (Ryc. 1A).

Biosynteza etylenu zachodzi w trzech etapach (Ryc. 1A etap. 1, 2, 3). W pierwszym z nich cząsteczka metioniny przekształcana jest w S-adenozyl-L-metioninę (SAM). Przemianę tę katalizuje enzym syntetaza AdoMet (S-adenozylotransferaza ATP: metionina, EC 2.5.1.6). W następnym etapie SAM przekształcana jest w ACC (kwas 1-aminocyklopropano-l-karboksylowy) przez enzym syntazę ACC (liaza S-adenozyl-L-metionino metylotioadenozynowa, EC 4.4.1.14). Ostatnim etapem jest przekształcenie ACC w etylen. Przemianę tę katalizuje oksydaza ACC. Oprócz ACC w wyniku działania syntazy ACC powstaje również 5-metylotioadenozyna (MTA), która w cyklu Yanga zapoczątkowuje biosyntezę nowej cząsteczki metioniny (Ryc. 1A). W czasie przekształcania ACC w etylen przez oksydazę ACC, oprócz etylenu i dwutlenku węgla powstaje również cyjanowodór (Ryc. 1A etap 3). HCN — ulega detoksykacji w reakcji z cysteiną, w wyniku której powstaje beta-cyanoalanina i H<sub>2</sub>S (Ryc. 1C). Przemianę tę katalizuje enzym syntaza betacyanoalaninowa (EC 4.4.1.9). Enzym ten występuje u wszystkich dotychczas testowanych pod tym względem roślin wyższych. Jest to u większości roślin wyższych główna droga detoksykacji HCN [3, 4]. W toku dalszych przemian beta-cyanoalanina przekształcana jest w asparaginę lub gamma-glutamyl-beta-cyanoalaninę. Wydajny szlak detoksykacji zapobiega utrzymywaniu się wysokiego stężenia HCN w czasie intensywnej biosyntezy etylenu, co jest bardzo istotne, ponieważ HCN oprócz roli regulacyjnej (w niektórych procesach fizjologicznych np. w czasie kiełkowania nasion) jest inhibitorem oddychania komórkowego. W przypadku większości roślin oprócz głównej drogi oddechowej wrażliwej na HCN funkcjonuje droga alternatywna

\* Dr, Instytut Biologii Molekularnej i Biotechnologii UAM, 60-371 Poznań, ul. Międzychodzka 5



**Ryc. 1** 1A. Szlak biosyntezy etylenu w roślinach wyższych według [3.17]. Następujące enzymy katalizują poszczególne etapy biosyntezy: 1 — syntetaza AdoMet (S-adenozylotransferaza ATP: metionina, EC 2.5.1.6.); 2 — syntaza ACC (liaza S-adenozyl-L-metionino metyloioadenozynowa, EC 4.4.1.14.), 3 — oksydaza ACC. Na poszczególnych etapach biosyntezy powstają: SAM (S-adenozylometionina), ACC (kwas 1-aminocyklopropano-1-karboksyłowy). Na poszczególnych etapach cyklu Yanga powstają: MTA (5'-metylotioadenozyna), MTR (5'-metylotioryboza), MTR-1-P (5'-metylotiorybozo-1-fosforan), KMB (2-keto-4-metylotiomaślan), Met (metionina).

1B. Malonylacja ACC (kwas 1-amino-cyklopropano-1-karboksyłowy) katalizowana przez malonylotransferazę wg [17]. Donorem reszty malonianowej jest malonylo-koenzym A.

1C. Detoksykacja cyjanowodoru powstałego w czasie biosyntezy etylenu poprzez związanie go z L-cysteiną i przeprowadzenie w nietoksyczny związek beta-cyanoalaninę wg [4]. Reakcja katalizowana przez syntezę beta-cyanoalaninową.

1D. Związek pomiędzy szlakiem biosyntezy etylenu i szlakiem biosyntezy poliamin w roślinach wyższych według [24]. Stosowane skróty jak w 1A.

niewrażliwa na cyjanek [5].

W roślinie, w pewnych warunkach ACC tworzy koniugaty z innymi związkami. Najlepiej udokumentowanym koniugatem jest kwas 1-(malonylo-amino)

cyklopropano-1-karboksyłowy — MACC (Ryc. 1B). Przypuszcza się, że w warunkach fizjologicznych przekształcenie to jest nieodwracalne, chociaż opisano przypadki, gdy wysokie stężenie MACC indukowało

przejście MACC w ACC [6]. Przypuszcza się, że MACC w zależności od tego w jakiego rodzaju tkance dochodzi do jego produkcji może wpływać stymulująco bądź hamująco na produkcję etylenu [7-9]. Etylen reguluje w bardzo różny sposób swoją własną biosyntezę i zależy to od rodzaju tkanki oraz bodźca indukującego jego produkcję. W dojrzewających owocach oraz starzejących się po zapyleniu koronach kwiatowych produkcja etylenu podlega regulacji na zasadzie dodatniego sprzężenia zwrotnego [1, 3].

Do tej pory nie udało się oczyścić białka receptorowego etylenu, jakkolwiek w tkankach różnych roślin scharakteryzowano miejsca wiążące etylen [10, 11]. Białko receptorowe zlokalizowane jest błonowo, daje się wysycić etylenem, podlega kompetycyjnej inhibicji analogami etylenu i wykazuje bardzo duże powinowactwo do etylenu ( $k_d$  w zakresie  $10^{-9}$ - $10^{-11}$  M) [12].

Modelową rośliną do badań nad biosyntezą etylenu w czasie dojrzewania owoców jest pomidor, natomiast doskonałą techniką badawczą okazała się transformacja pomidora „genami” antysensownych RNA (w dalszej części pracy zamiast terminu antysensowny RNA używam skrótu A-RNA) enzymów związanych z dojrzewaniem.

Syntaza ACC jest przedostatnim enzymem w szlaku syntezy etylenu (Ryc. 1A etap 2). Ostatnim enzymem jest oksydaza ACC, określana również jako EFE-enzym (ang. *ethyleneforming enzyme*). Syntazy ACC i oksydazy ACC są kodowane przez wiele genów. Specyficzne bodźce i stresi lub stany fizjologiczne uruchamiają ekspresję różnych genów dla enzymów szlaku biosyntezy etylenu. U pomidora syntazę ACC koduje co najmniej 6 genów, spośród których dwa ulegają ekspresji w czasie dojrzewania owoców i starzenia się kwiatów [13-16]. Ich ekspresja w owocach pomidora (LE-ACS2, LE-ACS4) jest etylenozależna. U pomidora oksydazę ACC kodują trzy geny i tylko jeden z nich przejawia ekspresję zależną od poziomu etylenu [17-19]. U petunii stwierdzono istnienie czterech genów oksydazy ACC, a tylko jeden z nich ulega etylenozależnej ekspresji w czasie starzenia się korony kwiatu [20]. Kiedy u pomidora zablokujemy A-RNA mRNA oksydazy ACC (specyficznej dla dojrzewających owoców), następuje opóźnienie dojrzewania owoców, tak jak w przypadku zablokowania mRNA syntazy ACC, ponieważ zarówno zablokowanie przedostatniego jak i ostatniego enzymu szlaku syntezy etylenu prowadzi do obniżenia poziomu etylenu w komórce. W praktyce zauważa się jednak, że bardziej drastyczne obniżenie poziomu etylenu uzyskuje się, kiedy stosowana jest blokada mRNA syntazy ACC. Według Oellera i wsp. [21] przyczyną jest krótki czas życia polipeptydu syntazy ACC (czas połowicznego rozpadu tego białka wynosi 25 minut [22]). Przypuszczalnie blokada ekspresji genów przy pomocy A-RNA jest skuteczniejsza w przypadku genów kodujących białka o krótkim czasie życia. Nie

można również całkowicie wykluczyć możliwości, że bezpośredni prekursor etylenu, ACC, w roślinach z zablokowanym A-RNA mRNA oksydazy ACC, może być w niewielkiej ilości przekształcany w etylen na drodze nieenzymatycznej, powstające w komórce roślinnej aktywne formy tlenu w postaci wolnych rodników umożliwiają przejście ACC w etylen bez udziału enzymu [1, 14, 23]. Obserwacja dojrzewania „antysensownych” owoców (z zablokowanym A-RNA mRNA oksydazy ACC) wykazuje, że dojrzewanie tych owoców po podaniu im etylenu jest różne i zależy od tego w jakim stadium badane owoce zostały zerwane z krzaka [14]. P i c t o n i w s p. postulują, że różnica w dojrzewaniu „antysensownych” owoców zależy od faktu dłuższego lub krótszego pozostawiania ich na krzaku sugeruje, że w dojrzewanie owoców musi być zaangażowany jakiś czynnik X typu wzmacniacz dojrzewania (ang. *ripening enhancer*) importowany do owoców z innych części rośliny lub inhibitor tego procesu eksportowany z owoców do innych części rośliny [14]. Interesującym dodatkiem do tych rozważań jest sugestia Fraya i Griersona [24]. Biosynteza amin sperminy i spermidyny wymaga etapu przeniesienia grupy aminopropylowej z SAM-u (S-adenozylometioniny, Ryc. 1D) na putrescynę. W skórkach niektórych owoców, w których chemicznie zahamowano syntezę ACC, wzrasta poziom spermidyny [25]. Sugeruje to, że szlak biosyntezy etylenu i szlak biosyntezy poliamin współzawodniczy o SAM. Bezpośredni związek polegający na współzawodnictwie tych szlaków o SAM wykazano dla kilku roślin [25-27]. Według B i o n d i takie współzawodnictwo zachodzi jedynie wtedy, kiedy w komórce istnieje ograniczona ilość SAM-u [28]. Hamujący wpływ poliamin na produkcję etylenu może polegać na tym, że poliaminy są komórkowymi likwidatorami (ang. *scavenger*) wolnych rodników wymaganych przy przekształceniu ACC w etylen [28]. H a g e g e i w s p. [29, 30] wskazują również na dodatni wpływ poliamin na tworzenie MACC. W niektórych roślinach poliaminy hamują syntezę etylenu oraz procesy starzenia się [31]. Hamowanie dojrzewania „antysensownych” owoców (z zablokowaną syntezą etylenu) należałoby więc rozpatrywać jako wynik zablokowania syntezy etylenu, jak i zwiększonej produkcji poliamin lub innych metabolitów powstających z powodu akumulacji SAM-u. Według Fraya i Griersona [24] poliaminy mogłyby być właśnie tym eksportowanym z dojrzewających owoców do innych części rośliny inhibitorem dojrzewania, nieznanym czynnikiem X.

### III. Rola etylenu w regulacji procesów dojrzewania owoców i starzenia się kwiatów

Wśród owoców ze względu na tempo ich oddychania towarzyszące procesowi dojrzewania wyróżniamy: owoce o klimakterycznym typie dojrzewania, których dojrzewanie związane jest z gwałtownym zwiększe-

niem intensywności oddychania, dużym wzrostem produkcji etylenu oraz istotnymi zmianami w ich strukturze i składzie, oraz owoce o nieklimakterycznym typie dojrzewania, których dojrzewanie powyżej wspomnianych cech nie wykazuje. Do owoców klimakterycznych należą: awokado, pomidor, jabłko, gruszka, banan, melon, do owoców nieklimakterycznych zaliczamy np. pomarańczę, cytrynę, truskawkę. Wśród roślin kwiatowych klimakteryczny model starzenia spotykamy u tych, u których zapylenie doprowadza do wzmożonego wytwarzania etylenu i więdnienia korony kwiatowej.

Jeśli podamy zewnętrzny etylen dojrzałym zielonym owocom to doprowadzi to do przyspieszenia ich dojrzewania w porównaniu z owocami nietraktowanymi etylenem, natomiast zablokowanie biosyntezy etylenu w zielonych owocach opóźnia ich dojrzewanie. Dojrzewaniem owoców sterują dwa mechanizmy komórkowe: mechanizm rozwojowy, niezależny od etylenu, odpowiedzialny za transkrypcyjną aktywację bądź represję pewnych genów; oraz mechanizm zależny od etylenu. Rola etylenu polega na jego udziale w aktywacji transkrypcji pewnych genów związanych z procesami dojrzewania i jednocześnie regulacji translacji mRNA niektórych białek. Dla pomidora znanych jest już wiele mRNA specyficznie pojawiających się w czasie dojrzewania, jednak szczegółowo scharakteryzowanych jest kilkanaście. Funkcja większości tych białek nie jest znana. Poniżej przedstawię tylko kilka przykładów. Dla pomidora analizowano ekspresję genów: E17 (gen białka wykazującego homologię do inhibitora proteinazowego I), E4 (gen białka o sekwencji aminokwasowej podobnej do sekwencji aminokwasowej reduktazy metioninowej z *E coli*), E8 (przypuszczalnie gen dioksygenazy spokrewnionej z oksydazą ACC), [32]. Jedynie ekspresja genu białka E4 wydaje się być zależną od poziomu etylenu, ponieważ w owocach „antysensownych” (z zablokowanym mRNA syntazy ACC przez A-RNA) nie ma jego mRNA; mRNA białka E17 w owocach „antysensownych” ma poziom zmniejszony o około 50%. W owocach „antysensownych” potraktowanych etylenem, mRNA E4 jednak się nie pojawia, co prowadzi do konkluzji, że oprócz regulacji etylenowej ekspresja genu E4 zależy jeszcze od innych genów, prawdopodobnie sterowanych rozwojowo. Transformanty pomidorów z wprowadzonym „genem” A-RNA E8 (w wyniku tego następuje zablokowanie ekspresji genu E8) wytwarzają w czasie dojrzewania pomidorów około sześciokrotnie większą ilość etylenu niż rośliny kontrolne. Białko E8 kodowane jest przez kilka genów [33]. Jego brak prowadzi do przerwania przekazywania sygnału etylenowego, co mimo dużej ilości wytwarzanego etylenu, komórka roślinna interpretuje jako brak etylenu i uaktywnia mechanizmy zwiększające jeszcze jego produkcję [17]. Niektórzy autorzy przypisują białku E8 funkcję oksydazy receptora etylenowego. Według nich białkowy receptor etylenu o charakterze

metaloproteiny jest utleniany przez oksydazę i jego utleniona forma podlega aktywacji etylenem [17].

Specyficzną cechą dojrzewających owoców jest ich „mięknienie” spowodowane zmianami w strukturze celulozy, hemicelulozy i pektyn będących głównymi składowymi ścian komórkowych. Odpowiedzialnymi za te zmiany są enzymy określane mianem hydrolaz ścian komórkowych [34]. Aktywność ich wzrasta w czasie procesu dojrzewania. Dotychczas najlepiej poznana jest poligalakturonaza [35]. Jest ona enzymem kluczowym w procesie rozkładu ścian komórkowych. Zablokowanie jej mRNA przy pomocy A-RNA zwalnia tempo mięknienia i przejrzenia owoców. W pomidorach zwiększonej aktywności tego enzymu towarzyszy zarówno zwiększenie ilości jego mRNA, jak i zwiększenie ilości enzymatycznego białka [32]. Zablokowanie szlaku biosyntezy etylenu (przy pomocy A-RNA) nie zmienia poziomu mRNA poligalakturonazy w porównaniu z jej poziomem w nietransformowanym owocu kontrolnym, natomiast w transformancie nie występuje białko tego enzymu. Potraktowanie takich pomidorów egzogennym etylenem prowadzi do pojawienia się w owocach aktywnej poligalakturonazy [32]. Należy więc uznać, że transkrypcja genu poligalakturonazy jest regulowana rozwojowo, natomiast translacja podlega regulacji etylenem [32].

Syntaza fitoenu i desaturaza fitoenu papryki i pomidora są jednymi z ważniejszych enzymów zaangażowanych w syntezę prekursorów karotenu [36]. W przeciwieństwie do pomidora, papryka jest owocem nieklimakterycznym, chociaż obydwie rośliny należą do rodziny psiankowatych. Geny desaturaz fitoenu papryki i pomidora (te geny, których ekspresja związana jest z dojrzewaniem) wykazują dużą homologię [37], podobnie dużą homologię wykazują geny syntaz fitoenu z obydwu wymienionych roślin [38]. W „antysensownych” owocach pomidora (transformant z obniżoną produkcją etylenu) obserwuje się znacząco zredukowany poziom mRNA syntazy fitoenu i silnie obniżony poziom karotenów (likopenu) w owocach [39]. Podanie egzogennego etylenu prowadzi do osiągnięcia przez te owoce normalnego poziomu mRNA syntazy fitoenu i do wzrostu ilości likopenu. Ekspresja genu syntazy fitoenu pomidora jest etylenozależna. W czasie dojrzewania owoców papryki (dojrzewanie niekontrolowane przez etylen) poziom mRNA syntazy fitoenu papryki jest tylko nieco większy niż normalnie [38]. Możemy stąd wywnioskować, że regulacja ekspresji genu syntazy fitoenu tak blisko spokrewnionych roślin jest całkowicie odmienna. Dojrzewaniu owoców papryki towarzyszy zwiększająca się aktywność desaturazy fitoenu, lecz nie zwiększa się poziom mRNA tego enzymu. Przypomina to sytuację z mRNA poligalakturonazy u pomidora, gdzie brak etylenu nie wpływa na poziom mRNA tego enzymu, jednak warunkuje występowanie aktywnego enzymatycznie białka [32]. Pojawia się pytanie: jaki związek bądź związki wpływają na zwiększoną

translację mRNA desaturazy u papryki, jaki związek w owocach nieklimakterycznych pełni rolę analogiczną do roli etylenu?

Wśród mutantów pomidora istnieją takie, które posiadają zmienione cechy dojrzewania. Zmiany te często polegają na niezdolności owoców do zmięknienia i osiągnięcia właściwego smaku i zapachu. Z analiz genetycznych wynika, że odpowiada za to zmutowany gen określany w literaturze nazwą *rin* (ang. ripening inhibitor). Istnieje hipoteza zgodnie z którą gen ten miałby kodować białko regulatorowe kontrolujące ekspresję całego spektrum genów związanych z dojrzewaniem, a między innymi genu poligalakturonazy [40, 41]. W czasie dojrzewania owoców pomidora poziom mRNA poligalakturonazy wzrasta kilkusetkrotnie, natomiast wśród mutantów *rin* są takie, które wykazują poziom mRNA tego enzymu równy 0,5% poziomu normalnego [42]. Zjawisko jest o tyle intrygujące w przypadku właśnie poligalakturonazy, gdyż w haploidalnym genomie pomidora istnieje tylko jeden gen tego białka, natomiast na poziomie białka istnieją trzy formy tego enzymu [43]. Tylko jedna z nich jest specyficzna dla dojrzewania [44] i właśnie translacja tego transkryptu podlega kontroli etylenowej. U jednego z mutantów *Nr* (ang. *never ripe*) opisanego przez *L a n a h a n a* [45] cechującego się niedojrzewającymi owocami mutacja polega na niewrażliwości na etylen w czasie kwitnienia i dojrzewania. Niezapyłone kwiaty mutantu *Nr* pozostają na roślinie i ich płatki są niezwiędnięte w czasie dłuższym niż u kwiatów normalnych. Jeśli kwiat *Nr* zostaje zapyłony to zapoczątkowany rozwój owocu nie wiąże się ze starzeniem płatków kwiatu [45]. Z analiz genetycznych wynika, że odpowiedzialny za to jest jeden gen.

Starzenie się kwiatów klimakterycznych poprzedzone jest gwałtownym wzrostem produkcji etylenu przez korony kwiatowe. Etylen zaangażowany jest w aktywację genów starzenia (ang. *senescence-related gene*), ich wzmożona ekspresja prowadzi do programowanej śmierci komórki [46-49]. Rośliną kwiatową dobrze pod tym względem przebadaną jest goździk ogrodowy (*Dianthus caryophyllus*). Zwiększenie produkcji etylenu w czasie starzenia się płatków goździka ma charakter autokatalityczny i następuje w wyniku biosyntezy *de novo* syntazy i oksydazy ACC specyficznej dla płatków [46, 49]. *W o o d s o n* i w s p. [50] stwierdzili, że umieszczenie preklimakterycznego kwiatu goździka w atmosferze egzogenego etylenu prowadzi do pojawienia się w jego płatkach mRNA syntazy ACC specyficznej dla starzejących się płatków [50]. W tkankach wegetatywnych etylen blokuje swoją produkcję np. można zablokować ekspresję genu syntazy ACC specyficznie indukowanej w czasie zranienia przez podanie etylenu z zewnątrz [51]. Zranienie liści goździka powoduje szybki wzrost produkcji etylenu przez te liście, lecz specyficzny dla starzejących się kwiatów transkrypt syntazy ACC [51] jest nieobecny w zranio-

nych liściach, jak również jest nieobecny w zranionych płatkach kwiatowych, jeśli te w czasie ich ranienia były w fazie preklimakterycznej [50].

Problemem jest to, w jaki sposób biosynteza etylenu indukowana jest bez obecności etylenu. Wydaje się, że wszystkie roślinne tkanki wytwarzają minimalną ilość etylenu. W kwiatach i owocach wraz z osiągnięciem odpowiedniego stadium rozwoju pojawia się zdolność odpowiedzi na ten niski poziom etylenu w postaci zwiększonej jego produkcji [48, 50, 52, 53]. W odpowiedzi na etylen w płatkach akumulują się transkrypty specyficznej dla płatków syntazy ACC i oksydazy ACC. Podanie ściętym, preklimakterycznym kwiatom kompetycyjnego inhibitora działania etylenu NBD (2,5-norbornadien) zapobiega akumulacji tych transkryptów [53]. Syntaza ACC, która po zapyleniu kwiatu ulega ekspresji w szyjce słupka jest kodowana przez inny gen niż syntaza ACC ze starzejących się płatków. Tylko ekspresja genu tej ostatniej jest indukowana etylenem. W liściach goździka potraktowanych auksynami dochodzi od 50 do 100-krotnego wzrostu produkcji etylenu [50]. Jednak całkowity RNA wyizolowany z takich liści nie zawiera transkryptu syntazy ACC specyficznej dla starzejących się płatków ani też transkryptu syntazy ACC indukowanej zranieniem. W odpowiedzi na auksyny indukowana jest ekspresja jeszcze innego genu syntazy ACC.

U *petunii* zwiększona produkcja etylenu następuje już po 5 minutach od zapylenia, a po 2,5 godzinie zapyłone znamię słupka produkuje 20 razy więcej etylenu niż znamię niezapyłonej *petunii* kontrolnej [54]. Zastosowanie na znamię inhibitora biosyntezy białka przed zapyleniem zapobiega wzrostowi produkcji etylenu po zapyleniu, natomiast zastosowanie inhibitorów syntezy RNA na znamię *petunii* zapobiega tylko częściowo. Prawdopodobnie mRNA syntazy ACC jest ciągle obecny w komórkach znajdujących się na powierzchni znamienia, a zapylenie indukuje syntezę enzymu [54]. Zapylenie nie zmienia aktywności oksydazy ACC, której ekspresja w tkankach znamienia sterowana jest rozwojowo. Pyłek zawiera dużą ilość ACC, a na powierzchni znamienia aktywność oksydazy ACC jest najwyższa, więc mogłoby to tłumaczyć nagłą syntezę etylenu po zapyleniu. Nie jest to jednak przyczyną pierwszego gwałtownego zwiększenia produkcji etylenu przez znamię, ponieważ na jego powierzchni znajduje się lepka substancja i skutecznie zapobiega szybkiej penetracji ACC z pyłku do znamienia [54].

Według *W o o d s o n a* [53] elicytory specyficzne dla zranienia (wywołanego wskutek wzrastania pyłku) lub specyficzne dla pyłku indukują ekspresję syntazy ACC specyficznej dla słupka, doprowadza to do zwiększenia poziomu etylenu w słupku, etylen dyfundując do płatków indukuje tam ekspresję etylenozależnych genów syntazy ACC i oksydazy ACC. W płatkach, dochodzi do zwielokrotnienia produkcji etylenu i odpowiedni jego poziom „włącza” transkrypcję genów lub zwielokrotnia translację mRNA genów odpowie-

działnych za przemiany doprowadzające do starzenia się płatków.

Odmienne niż u goździka i petunii następuje indukcja syntezy etylenu po zapyleniu storczyka *Phalaenopsis* [55]. W znamieniu storczyka następuje indukcja ekspresji oksydazy ACC. W znamionach kwiatów niezapylnych mRNA tego enzymu jest nieobecny. Tkanki niezapylnego kwiatu *Phalaenopsis* są niezdolne do przekształcenia ACC w etylen, z czego należy wnioskować, że u *Phalaenopsis* synteza etylenu (na tym etapie jego biosyntezy) jest regulowana między innymi „włączeniem” ekspresji genu oksydazy ACC [55]. Jest to sytuacja całkowicie odmienna niż u goździka i petunii, u których ekspresja genu oksydazy ACC w znamieniu i tkankach słupek jest regulowana rozwojowo. U *Phalaenopsis* zapylenie powoduje syntezę de novo oksydazy ACC. Również sposób indukcji syntezy etylenu w płatkach kwiatu musi być odmienny, ponieważ pyłek storczyków umieszczony na znamieniu kiełkuje w ciągu kilku dni, więc nie jego kiełkowanie jest bodźcem indukującym syntezę de novo oksydazy ACC. W tym przypadku musi istnieć inny, zdolny do dyfuzji czynnik „włączający” po zapyleniu cały program autokatalitycznej syntezy etylenu. Starzenie się kwiatu *Phalaenopsis* poprzedza autokatalityczna produkcja etylenu, tak jak u goździka i petunii, i tak jak w ich przypadku opóźnienie tego procesu można osiągnąć stosując kompetycyjny inhibitor etylenu NBD. Różnica w ekspresji genu oksydazy ACC w znamieniu i słupek, taka jaka istnieje między goździkiem i petunią a *Phalaenopsis*, może być odpowiedzialna za długowieczność niezapylnych kwiatów storczyka.

Mechanizmy decydujące o więdnieniu koron kwiatów klimakterycznych nie są do końca poznane, jednak bez wątpliwości można stwierdzić, że rola etylenu w przyspieszeniu tego procesu jest ogromna.

#### IV. Udział etylenu w procesie degradacji systemów błonowych komórki roślinnej

Procesy starzenia się komórki roślinnej cechują się gwałtownymi, nieodwracalnymi zmianami ilościowymi i jakościowymi w składowych ścian komórkowych oraz degeneracją systemu błonowego. Zaburzona zostaje kompartmentacja, a tym samym cały metabolizm komórki. Etylen jest hormonem, który roślina wytwarza przez cały czas swojego życia. Różnice w ilości etylenu produkowanego przez tkanki roślinne są jednak olbrzymie. Degeneracja błon komórkowych jest również zjawiskiem zachodzącym w ciągu całego życia rośliny, jednak przed stadium starzenia się zachodzi ona w ograniczonym stopniu i jest elementem normalnej wymiany składowych błon. Podstawowymi enzymami w procesie degradacji lipidów są fosfolipaza D oraz fosfataza fosfatydanowa. Enzymy te są enzymami konstytutywnymi, jednak w czasie starzenia się tkanek roślinnych aktywność ich wzrasta kilkukrotnie [12]. Aktywność ich jest silnie stymulowana

przez  $Ca^{+2}$ . W płatkach goździka katabolizm lipidów błonowych oraz peroksydacja nienasyconych kwasów tłuszczowych ulega przyspieszeniu po potraktowaniu płatków egzogennym etylenem [56, 57]. Mechanizm działania etylenu w tym przypadku nie jest znany. Według Poliyath i Droillard sprawcą podwyższonej aktywności enzymów zaangażowanych w rozkład lipidów jest  $Ca^{+2}$ , natomiast uwolnienie  $Ca^{+2}$  z kompartmentów błonowych, w których normalnie się znajduje, w dużej części zachodzi za sprawą etylenu [12]. Receptory etylenu zlokalizowane są błonowo w obrębie retikulum endoplazmatycznego, kanały wapniowe również [12]. Nie zbadano dotąd związków jakie między nimi zachodzą. Stwierdzono, natomiast silny wpływ zewnętrznie podanego etylenu na obniżenie aktywności pompy  $Ca^{+2}$ . W kwiatkach goździka w fazie preklimakterycznej można uzyskać 50% spadek aktywności pompy  $Ca^{+2}$  w ciągu 5 godzin od potraktowania kwiatów etylenem [58]. Obniżenie jej aktywności pociąga za sobą podwyższenie stężenia  $Ca^{+2}$  w cytozolu, to zwiększenie aktywności dwu podstawowych enzymów ze szlaku katabolizmu lipidów [12]. Produkty rozpadu lipidów mogą w sposób jonoforowy prowadzić do dalszego uwalniania  $Ca^{+2}$  do cytozolu. Pewien rodzaj kwasów tłuszczowych np. krótkie 8, 9, 10-cio węglowe kwasy tłuszczowe zwiększają powinowactwo pomiędzy etylenem a jego receptorami [12].

#### V. Aspekty biotechnologiczne badań nad szlakiem biosyntezy etylenu

Z chwilą ustalenia szlaku biosyntezy etylenu w dojrzewających owocach oraz jego roli przyspieszacza i regulatora procesów dojrzewania i starzenia, stało się oczywistym wykorzystanie tej wiedzy do skonstruowania roślin transgenicznych cechujących się spowolnieniem wspomnianych procesów. Najdogodniejszą rośliną okazał się pomidor, jest on ważny gospodarczo i jednocześnie jego transformacja nie stanowi problemu. Roczna światowa produkcja pomidorów w 1990 roku wynosiła około 69 milionów ton [59]. W dziedzinie biotechnologii roślin eksperymenty z pomidorem stanowią najbardziej klarowny przykład tego co można osiągnąć blokując ekspresję specyficznych genów ze szlaku biosyntezy etylenu związanych z dojrzewaniem owoców. Najlepsze wyniki w zablokowaniu produkcji etylenu w owocach pomidora osiągnął Oeller i w s.p. [60] wprowadzając do pomidora „gen” A-RNA syntazy ACC. Wśród uzyskanych przez niego transformantów znalazł się taki, który produkował 0,5% etylenu w porównaniu z kontrolnym owocem nietransformowanego pomidora. „Antysensowne” owoce tego transformanta umieszczone w otoczeniu powietrza nigdy nie dojrzewają, natomiast normalny pomidor zaczyna produkować etylen po około 50 dniach od zapylenia, a w pełni dojrzewa 10 dni później [17]. „Antysensowne” owoce tego transformanta



w ciągu 90-150 dni co najwyżej zabarwiają się na kolor pomarańczowy, lecz nie stają się miękkie ani aromatyczne [17]. Ich dojrzewanie można osiągnąć podając z zewnątrz etylen lub jego analog propylen. Pozostawienie owoców przez 6 dni w otoczeniu etylenu prowadzi do pełnego dojrzewania, stają się nieodróżnialne od owoców normalnych. Usunięcie etylenu w momencie, kiedy osiągnęły już dojrzałość zapobiega przejrzeniu, zjawiska typowego dla normalnych pomidorów.

Inne podejścia zaprezentował Hamilton i wsp. [61] wprowadzając do pomidora „gen” A-RNA oksydazy ACC, co prowadzi do obniżenia poziomu etylenu w dojrzewających owocach pomidora, jednak nie tak dużego jak w przypadku zablokowania syntazy ACC.

Produkcję etylenu w roślinie można obniżyć przez wprowadzenie do rośliny genu enzymu rozszczepiającego prekursor etylenu ACC. Sposób ten z powodzeniem zastosował Klee [62, 63]. Wprowadził on do pomidora gen bakteryjnego enzymu deaminazy ACC. Deaminaza ACC katalizuje przejście ACC w alfa-ketomaślan. Uzyskane przez Klee transformanty wykazywały obniżoną produkcję etylenu (inhibicja syntezy etylenu od 90 do 97% [64, 65]). Owoce tych transformantów pozostają twarde i jędrne o 6 tygodni dłużej niż owoce pomidora nietransformowanego.

Inną metodą obniżającą poziom etylenu jest wprowadzenie do rośliny dodatkowych genów kodujących enzym malonylotransferazę. Enzym ten przeprowadza ACC w malonylo-ACC (Ryc. 1B) i tym samym obniża produkcję etylenu [63, 65].

Obecnie na zachodnie rynki trafiły transformanty pomidora z zablokowaną A-RNA ekspresją genu poligalakturonazy (oczywiście w tym przypadku nie chodzi o sterowanie dojrzewaniem przy pomocy etylenu). Owoce tych transformantów cechują się większą jędrnością i zahamowanym procesem przejrzenia, nie wykazując jednocześnie zmian w smaku i zapachu w porównaniu z owocami normalnymi [66-68].

Znacznie mniej informacji istnieje co do technik blokowania produkcji etylenu w kwiatach metodami inżynierii genetycznej. Zastosowanie analogicznego postępowania jak w przypadku pomidorów przypuszczalnie daje te same wyniki, lecz celem są kwiaty i czas ich życia. Jednak kwiatów nie jemy i czas ich życia możemy znacznie wydłużyć sposobami chemicznymi. Znakomitymi przedłużaczami życia kwiatów są inhibitory syntezy etylenu (np. AVG, inhibitor syntazy ACC) lub inhibitory jego działania (np. NBD, jony srebrne) [69, 70].

W przedstawionym rozdziale nie omawiałam konstrukcji transformantów, problemu selekcji (użycie antybiotyków) oraz wynikających z tego zagrożeń przy pochopnym wprowadzeniu na rynek zmodyfikowanych roślin. Problemy te są bardzo istotne, lecz nie mieszczą się już w ramach tej pracy.

Artykuł otrzymano 22 sierpnia 1995 r.

Zaakceptowano do druku 14 grudnia 1995 r.

## Piśmiennictwo

1. Yang SF, Hoffman NE (1984) *Ann Rev Plant Physiol* **35**: 155-189
2. Adams DO, and Yang SF (1979) *Proc Nat. Acad Sci USA* **76**: 170-174
3. Kende H (1993) *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **44**: 283-307
4. Yip W-K, Yang SF (1988) *Plant Physiol* **88**: 473-476
5. Musgrave ME, Siedow JN (1987) W: Newman DW, Wilson KG (red) *Models in Plant Physiology and Biochemistry*, CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, vol. 1, 109-112
6. Jiao X-Z, Philosoph-Hadas S, Su L-Y, Yang SF (1986) *Plant Physiol* **81**: 637-641
7. Philosoph-Hadas, Meir S, Aharoni N (1985) *Physiol Plant* **63**: 431-437
8. Yang C, Wilksch W, Wild A (1994) *J Plant Physiol* **143**: 389-395
9. Liu Y, Hoffman NE, Yang SF (1985) *Planta* **164**: 565-568
10. Sisler EC (1991) *The plant hormone ethylene* Mattoo AK, Suttle JC ed. CRC Boca Raton Florida, 81-99
11. Sanders IO, Smith AR, Hall MA (1991) *Planta* **183**: 209-217
12. Palyath G, Droillard MJ (1992) *Plant Physiol Biochem* **30**: 789-812
13. Olson DC, White JA, Edelman L, Harkins RN, Kende H (1991) *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 5340-5344
14. Picton S, Barton SL, Bouzayen M, Hamilton AJ, Grierson D (1993) *The Plant Journal* **3**: 469-481
15. Hamilton AJ, Bouzayen M, Grierson D (1991) *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 7434-7437
16. Holdsworth MJ, Schuch W, Grierson D (1988) *Plant Mol Biol* **11**, 81-88
17. Theologis A (1992) *Cell* **70**: 181-184
18. Rottmann WE, Peter GF, Oeller PW, Keller JA, Shen NF, Nagy BP, Taylor LP, Campbell AD, Theologis A (1991) *J Mol Biol* **222**: 937-961
19. Yip WK, Moore T, Yang SF (1992) *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 2475-2479
20. Tang X, Wang H, Brand AS, Woodson WR (1994) *Plant Mol Biol* **23**: 1151-1164
21. Oeller PW, Lu Min-Wong, Taylor LP, Pike DA, Theologis A (1991) *Science* **254**: 437-439
22. Kende H, Boller T (1981) *Planta* **151**: 476
23. Kacperska A, Kubacka-Zębalska M (1989) *Physiol Plant* **77**: 231-237
24. Fray RG, Grierson D (1993) *Trends in Gen* **9**: 438-443
25. Even-Chen Z, Mattoo AK, Goren R (1982) *Plant Physiol* **69**: 385-388
26. Biondi S, Diaz T, Iglesias I, Gamberini G, Bagni N (1990) *Physiol Plant* **78**: 475-483
27. Roustan JP, Latche A, Fallot J (1992) *Plant Physiol Biochem* **30**: 201-205
28. Biondi S, Hagege D, Rossini P, Bagni N (1993) *Physiol Plant* **89**: 699-706
29. Hagege D, Kevers C, Geuns J, Gaspar T (1994) *J Plant Physiol* **143**: 722-725
30. Hagege D, Kevers C, Gaspar T (1991) *Physiol Plant* **82**, 397-400
31. Apelbaum A (1981) *Plant Physiol* **68**: 453-456
32. Theologis A, Oeller PW, Wong L-M, Rottmann WH, Gantz DM (1993) *Developmental Genetics* **14**: 282-295
33. Deikman J, Fischer RL (1988) *EMBO J* **7**: 3315-3320
34. Fischer RL, Bennett AB (1991) *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **42**, 675-703
35. Margossian LI, Federman AD, Giovannoni JJ, Fisher RL (1988) *Proc Natl Acad Sci USA* **85**: 8012-8016
36. Bartley GE, Scolnik PA (1994) *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **45**: 287-301
37. Huguency P, Romer S, Kuntz M, Camara B (1992) *Eur J Biochem* **209**: 399-407
38. Romer S, Huguency P, Bouvier F, Camara B, Kuntz M (1993) *Biochim Biophys Res Comm.* **196**: 1414-1421
39. Davies KM, Hobson GE, Grierson D (1990) *J Plant Physiol* **135**: 708-713

40. Knapp JF, Moureau P, Schuch W, Grierson D (1989) *Plant Mol Biol* 12: 105-116
41. Schuch W, Bird CR, Ray J, Smith CJS, Watson CF, Morris PC, Gray JE, Arnold C, Seymour GB, Tucker GA, Grierson D (1989) *Plant Mol Biol* 13: 303-311
42. Della Penna D, Alexander DC, Bennett AB (1986) *Proc Natl Acad Sci USA*, 83: 6420-6424
43. Bird CR, Smith CJS, Ray JA, Moureau P, Bevan MW, Bird AS, Hughes S, Morris PC, Grierson D, Schuch W (1988) *Plant Mol Biol* 11: 651-662
44. Tucker GA, Robertson NG, Grierson D (1981) *Eur J Biochem* 115: 87-90
45. Lanahan MB, Yen H-C, Giovannoni JJ, Klee HJ (1994) *The Plant Cell* 6: 521-530
46. Borochoy A, Woodson WR (1989) *Hort Rev* 11: 15-43
47. Lawton KA, Huang B, Goldsbrough PB, Woodson WR (1989) *Plant Physiol* 90: 690-696
48. Lawton KA, Raghothama KG, Goldsbrough PB, Woodson WR (1990) *Plant Physiol* 93: 1370-1375
49. Wang N, Woodson WR (1989) *Plant Physiol* 89: 434-438
50. Park KY, Drory A, Woodson WR (1992) *Plant Molecular Biology* 18: 377-386
51. Nakajima N, Mori H, Yamazaki K, Imaseki H (1990) *Plant Cell Physiol* 31: 1021-1029
52. Woodson WR, Lawton KA (1988) *Plant Physiol* 87: 498-503
53. Woodson WR, Park KY, Drory A, Larsen PB, Wang H (1992) *Plant Physiol* 99: 526-532
54. Pech JC, Latche A, Larriguadiere C, Reid MS (1987) *Plant Physiol Biochem* 25: 431-437
55. Nadeau JA, Zhang XS, Nair H, O'Neill SD (1993) *Plant Physiol* 103: 31-39
56. Sylvestre I, Paulin A (1987) *Physiol Plant* 70: 530-536
57. Sylvestre I, Droillard MJ, Bureau JM, Paulin A (1989) *Plant Physiol Biochem* 27: 407-413
58. Paliyath G, Thompson JE (1988) 88: 295-302
59. Grierson D, Schuch W (1993) *Phil Trans R Soc Lond* 342, 241-250
60. Oeller PW, Lu MW, Taylor LP, Pike DA, Theologis A (1991) *Science* 254: 437-439
61. Hamilton AJ, Bouzayen M, Grierson D (1991) *Proc. Natl Acad Sci USA* 88: 7434-7437
62. Klee HJ, Hayford MB, Kretzmer KA, Barry GF, Kishore GM (1991) *Plant Cell* 3: 1187-1193
63. Comai L (1993) *Ann Rev Nutr* 13: 191-215
64. Theologis A, Zarembinski TI, Oeller PW, Liang X, Abel S (1992) *Plant Physiol* 100: 549-551
65. Klee HJ, Hayford MB, Kretzmer KA, Barry GF, Kishore G (1991) *The Plant Cell* 3: 1187-1193
66. Sheehy RE, Kramer M, Hiatt WR (1988) *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 8805-8809
67. Smith CJS, Watson CF, Ray I, Bird CR, Morris PC, Schuch W, Grierson D (1988) 334: 724-726
68. Watson CF, Zheng L, Della Penna D (1994) *The Plant Cell* 6: 1623-1624
69. Toshima H, Niwayama Y, Nagata H, Greulich F, Ichihara A (1993) *Biosci Biotech Biochem* 57: 1394-1395
70. Wang H, Woodson WR (1989) *Plant Physiol* 89, 434-438

## Biochemia w sieci

## Biochemistry on the network

### MACIEJ DROŹDŹ

Internet to największa na świecie sieć komputerowa. Jest ogromnym zbiorem informacji dostępnej dla każdego, kto dysponuje komputerem podłączonym do niej. Gdy mówimy o sieci komputerowej mamy na myśli dwa, lub więcej, komputery połączone ze sobą fizycznie, lub bez fizycznego kontaktu (fale radiowe) w celu wymiany zorganizowanych w pliki danych.

Idea Internetu jest stosunkowo nie nowa. Pochodzi z lat 60, ale prawdziwa eksplozja popularności (związana z przewyciężeniem technicznych trudności) rozpoczęła się w roku 1990 (dane statystyczne dostępne pod adresem [nis.nsf.net](mailto:nis.nsf.net)). Tak dynamiczny rozwój Internetu związany jest z jego niejako wczesobecnością. Każdy z użytkowników może tworzyć własne dokumenty, które będąc dostępne dla pozostałych, zwiększają ogólną ilość informacji zawartej w sieciach.

Instytut Biologii Doświadczalnej PAN im. M. Nenckiego, ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa  
Kowanówko ul. Poziomkowa 22 64-600 Oborniki Wlkp. woj. poznańskie

Prognozy na przyszłość dotyczące sieci komputerowych są bardzo optymistyczne, włącznie z wyparciem tradycyjnego radia i telewizji.

Sieć Internetu jest ogólnie dostępna na świecie. Mało jest placówek badawczych czy uniwersytetów bez dostępu do sieci. Swoje „końcówki” posiadają nawet stacje polarne na Antarktydzie.

W Internecie możemy znaleźć informację na każdy temat, poczynając od globalnej sytuacji żywnościowej przez satelitarne zdjęcia kuli ziemskiej w świetle widzialnym i podczerwieni, obrazy komputerowe trzeciorzędowej struktury DNA, RNA, enzymów (można oglądać poszczególne domeny lub miejsca restrykcyjne) do grup dyskusyjnych, interesujących się jedną z gier komputerowych.

Istnieje kilka sposobów korzystania z tych rodzajów, mianowicie:

- poczta elektroniczna (ang. electronic mail lub ogólnie znana jako e-mail)
- anonimowy ftp (ang. anonymous File Transferring Protocol)

**Tabela 1.**

Podstawowe protokoły Internetu

nazwa	zastosowanie	przykłady
poczta elektroniczna (e-mail)	<ul style="list-style-type: none"> <li>przesyłanie informacji</li> <li>udział w dyskusjach (Usenet, listy adresowe, grupy dyskusyjne)</li> </ul>	listy
telnet	kontakt z innym komputerem	dowolne korzystanie ze zbiorów na zasadzie client/server przeszukiwanie baz danych itp.
talk	umożliwia kontakt dwóch (lub więcej) użytkowników sieci w czasie realnym	IRC
FTP*	przesyłanie plików	korzystanie z zasobów innych użytkowników

\* korzystamy z anonimowego FTP (ang. anonymous FTP)

— telnet

— talk (lub jego rozbudowana i bardzo popularna ostatnio wersja mianowicie IRC (Internet Relay Chat), (Tab. 1).

Protokoły te stworzone pierwotnie dla systemu operacyjnego UNIX nie przedstawiają się zbyt atrakcyjnie. W związku z ogromnym zapotrzebowaniem na szybkość i estetykę podania informacji powstały programy umożliwiające efektywne jej poszukiwania i przyjazną dla użytkownika formę prezentacji.

Jednym z pierwszych programów przeszukujących sieci, a właściwie tylko miejsca dostępne dla anonimowego FTP (patrz poniżej) był sławny już dziś Archie. Następnie powstały: Gopher, WAIS, oraz WWW (czyli World Wide Web), najbardziej ekscytujący sposób poszukiwań, dający szansę błądzenia po sieciach, jej badania i odkrywania. Oprócz programów takich jak Archie czy WAIS powstały bardzo szybkie programy umożliwiające owocne przeszukiwanie sieci w poszukiwaniu zadanego tematu, do takich należy Excite, Lycos, WebCrawler, WWW czyli World Wide Web Worm, (tabela 2). Po wpisaniu słowa lub interesujących nas słów kluczowych otrzymujemy listę adresów pod którymi możemy znaleźć artykuły z poszukiwaną przez nas treścią, uporządkowaną i przedstawioną w zależności od lokalizacji geograficznej bazy danych, spójności dokumentu z poszukiwanym przez nas słowem. Oczywiście to nie koniec. Powstały programy ingerujące wszystkie podane wyżej jak np. sławny MOSAIC czy Netscape. Programy te umożliwiają korzystanie z telnetu, ftp, e-mail, gophera, WAIS'a oraz oczywiście WWW, daje możliwość oglądania obrazów komputerowych, zdjęć (jak np. aktualizowane co pół godziny (!) zdjęcie pewnego laboratorium na

**Tabela 2.**

Narzędzia Internetu

nazwa	adres
Excite	<a href="http://www.excite.com/">http://www.excite.com/</a>
WWW	<a href="http://www.cs.colorado.edu/~mcbryan/www.html">http://www.cs.colorado.edu/~mcbryan/www.html</a>
Lycos	<a href="http://lycos.cs.cmu.edu/">http://lycos.cs.cmu.edu/</a>
WebCrawler Searching	<a href="http://webcrawler.cs.washington.edu/WebCrawl/WebQuery.html">http://webcrawler.cs.washington.edu/WebCrawl/WebQuery.html</a>
WAIS	<a href="http://server.wais.com/">http://server.wais.com/</a>
Archie	<a href="http://web.nexor.co.uk/archie.html">http://web.nexor.co.uk/archie.html</a>
WWW*	telnet://www.njit.edu telnet://www.w3.org telnet://www.huji.ad.il

\* używamy www jako nazwę konta (ang. login name) i hasło (ang. password).

Bermudach). Warto też zauważyć, że oba działają w systemie Windows, a więc wszystko jest dostępne dla myszy bez znajomości zagadkowych czasem poleceń systemów UNIX czy DOS). Windows '95 jest już standardowo wyposażony w przeglądarkę (ang. browser) hipertekstowych stron sieci Internet.

W związku z tym, że praca biochemika wymaga często zbierania, przeglądania i analizowania czasem olbrzymich ilości danych, jak chociażby przy porównywaniu sekwencji aminokwasów czy zasad azotowych, istnieje wiele biologicznych, a w szczególności biochemicznych adresów w Internecie.

Między innymi dostępne są programy służące do analizy, porównywania i wprowadzania do baz danych sekwencji aminokwasów i zasad azotowych, np. BLAST (analiza), AuthorIn (wprowadzenie nowych danych), (Tab. 3.1). Programy prezentujące komputerowe obrazy cząsteczek białka i kwasów nukleinowych, wraz z jego sekwencją, autorem, tytułem czasopisma i artykułu (Tab. 3.2). W bazach danych dotyczących biologii molekularnej można znaleźć gotowe protokoły dotyczące różnych technik laboratoryjnych (np. ponad 50 artykułów dotyczących sekwencjonowania, izolowania i znakowania DNA), (tabela 3.3). Można znaleźć całe „grupy” informacji biologicznej, chociażby takie jak Collection of WWW Sites of Biological Interest, (tabela 3.4), w którym możemy odszukać np. mapy chromosomów ludzkich, (dane są aktualizowane co tydzień) (tabela 3.6), a także miejsca łączące wszystkie „biologicznie zorientowane gophery”, (Tab. 3.7).

Istnieje także możliwość korzystania z Medline przez sieć. Jest to jednak jedna z usług za którą należy płacić. Wymagane jest posiadanie własnego konta na komputerze, którego Internetowy adres to **cdplus.com**. Aby założyć sobie takie konto należy się bezpośrednio skontaktować z CDP Technologies Sales Department

**Tabela 3.**

Ciekawe adresy w Internecie

nazwa	adres
Blast	<a href="http://www.bio.cam.ac.uk/seqsrch/blast.html">http://www.bio.cam.ac.uk/seqsrch/blast.html</a>
obrazy struktur	<a href="http://www.gdb.org/Dan/proteins/nr13d.html">http://www.gdb.org/Dan/proteins/nr13d.html</a>
spis czasopism, kalendarium konferencji	<a href="http://www.ibb.waw.pl/biblioteka/journals.html">http://www.ibb.waw.pl/biblioteka/journals.html</a>
zbiór danych danych	<a href="http://mbisg2.sbc.man.ac.uk/special.html">http://mbisg2.sbc.man.ac.uk/special.html</a> <a href="http://www.abc.hu:80/biosites.html">http://www.abc.hu:80/biosites.html</a>
mapy chromosomów i nie tylko...	<a href="http://gdbwww.gdb.org/">http://gdbwww.gdb.org/</a>
Entrez	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Search/Entrez">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Search/Entrez</a>
Wybrane serwery WWW dla Biologii Molekularnej	<a href="http://www.lib.utexas.edu/libs/LSL/bioint.html">http://www.lib.utexas.edu/libs/LSL/bioint.html</a> <a href="http://www.tiac.net/users/dstein/nw408.html">http://www.tiac.net/users/dstein/nw408.html</a>
Wprowadzanie danych do Genbank	<a href="http://atlas.nlm.nih.gov:5700/htbinpost/BankIt/submit.html">http://atlas.nlm.nih.gov:5700/htbinpost/BankIt/submit.html</a>

tel. (800) 950-2035 wew. 400. Stosunkowo niedawno został wprowadzony bardzo ciekawy projekt, znany przede wszystkim z jego wersji na płytach kompaktowych, mianowicie program Entrez, który umożliwia min. korzystanie z Medline (w ograniczonym zakresie) oraz z kilku odmian programu Blast, (tabela 3.9). Istnieją oczywiste zalety korzystania z sieciowej wersji programu, jedną z nich jest fakt ciągłego uaktualniania danych.

Internet to nie tylko największa na świecie biblioteka, to także narzędzie umożliwiające szybką wymianę informacji. Oprócz wykorzystywanej szeroko poczty elektronicznej zostały wprowadzone programy umożliwiające spotkanie kilku użytkowników sieci. Do takich należy **talk** i jego nowa ulepszona wersja mianowicie **IRC** czyli Internet Relay Chat. Za pomocą tego ostatniego można kontaktować się z kilkoma rozmówcami, prowadząc z nimi swobodny dialog za pomocą klawiatury (należałoby tu jeszcze wspomnieć o znanej grze **MUD** z jej kilkoma odmianami oraz nowej wersji **IRC** dającej możliwość wirtualnego spotkania z innymi użytkownikami sieci).

Można wymieniać się doświadczeniami, spostrzeżeniami korzystać z usług **Usenetu**, który zawiera tzw. grupy dyskusyjne (ang. newsgroups). Takich grup jest naprawdę bardzo dużo, są podzielone na kilka sekcji i każdy może znaleźć coś ciekawego dla siebie (niekoniernie związane z pracą zawodową). Oczywiście istnieją specjalne grupy tematyczne poświęcone tylko biologii i wybranym jej działom. Oprócz tego można brać udział w poświęconych tematom biologicznym, elektronicznych konferencjach **BIOSCI** (Tab. 4).

**Tabela 4.**

Wybrane grupy tematyczne BIOSCI

ARABIDOPSIS	dyskusje na temat genomu Arabidopsis
BIO-JOURNALS	czasopisma o tematyce biologicznej w tabelach
BIOLOGICAL-INFORMATION	Zastosowania teorii informacji w biologii
BIONAUTS	Pytania i odpowiedzi dotyczące używania sieci, lokalizowanie adresów poczty elektronicznej
CHROMOSOME 22	Dyskusje dotyczące mapowania i sekwencjonowania ludzkiego chromosomu 22
EMPLOYMENT	Propozycje pracy
MOLECULAR-EVOLUTION	Dyskusje na temat ewolucji molekularnej
NEUROSCIENCE	Dyskusje na temat badań w dziedzinie neurobiologii
PROTEIN-ANALYSIS	Dyskusje dotyczące badań białek
TROPICAL-BIOLOGY	Dyskusje o postępach badań przyrody tropikalnej

Informacja o pozostałych grupach tematycznych oraz o zasadach dostępu do nich pod adresem:

- i) biosci-server@genbank.bio.net (e-mail)
- ii) genbank.bio.net (ftp, katalog „pub”)
- iii) <http://www.bio.net/> (WWW)

W Internecie znajdujemy też programy pozwalające odszukać adres poczty elektronicznej poszukiwanej przez nas osoby, są to min.: Netfinder, Paradise, X500, (Tab. 5). Korzystając z ich usług powinniśmy znać imię, nazwisko i adres (który nie jest konieczny ale przyspiesza poszukiwania). Niestety nie wszystkie osoby posiadające adres e-maila figurują w bazach danych ww. programów.

Jak już wspominałem specyfika sieci komputerowych jako źródła informacji polega na tym, że każdy może uczestniczyć w jej rozbudowie. Do niedawna było to związane z uruchomieniem własnego serwera, zakupem odpowiedniego oprogramowania i dużą wiedzą. Na początku grudnia 1995 roku pojawiła się szansa stworzenia własnej strony w Internecie (ang. *home page*) za darmo. Angielska firma Pipex oferuje

**Tabela 5.**

Poszukiwanie adresów poczty elektronicznej

nazwa	adres	hasło
Paradise	<a href="telnet://ipx1.mat.torun.edu.pl">telnet://ipx1.mat.torun.edu.pl</a>	de
X500	<a href="telnet://nic.funet.fi">telnet://nic.funet.fi</a> <a href="telnet://nic.switch.ch">telnet://nic.switch.ch</a>	dua dua
Netfind	<a href="telnet://netfind.uslib.cz">telnet://netfind.uslib.cz</a> <a href="telnet://nic.uakom.cs">telnet://nic.uakom.cs</a>	netfind netfind

0.5 MB dla każdego kto ma ciekawy pomysł, zna interesujące adresy w Internecie i chce się nimi podzielić z innymi, (adres <http://dspace.dial.pipex.com/>).

W ostatnich latach można zauważyć burzliwy rozwój sieci komputerowych także na terenie Polski. Istnieje wiele instytucji naukowych (przede wszystkim uniwersytetów), państwowych i komercyjnych posiadających dostęp do Internetu.

#### Podziękowania

Dziękuję koledze Arkadiuszowi Szklarczykowi za pomysł i pomoc w przygotowaniu powyższego artykułu.

Praca została napisana podczas pobytu w Instytucie im. M. Nenckiego PAN w Warszawie.

#### Źródła informacji:

1. Internet
2. The Internet Unleashed, 1994, Sams Publishing
3. New Riders' Official Internet Directory, New Riders Publishing, Indianapolis, Indiana

---

## Sprawozdania

Symposium "On Structure and Biological Functions of Nucleic Acid Components and their Analogues, Related Topics"

W dniach 2-5 września 1995 r. odbyło się w Instytucie Biochemii i Biofizyki PAN w Warszawie naukowe Symposium dedykowane Profesorowi Davidowi Shugarowi w 80. urodziny. Symposium patronował Instytut Biochemii i Biofizyki PAN oraz Zakład Biofizyki Instytutu Fizyki Doświadczalnej Uniwersytetu Warszawskiego. Zorganizowaniem imprezy zajął się Komitet pod przewodnictwem Kazimierza L. Wierzchowskiego w składzie: Irena Pietrzykowska (vice-przewodnicząca), Daniela Barszcz, Jarosław Kuśmirek, Tadeusz Chojnacki, Grażyna Muszyńska i Ryszard Stolarski. W bezpośredniej organizacji całego Jubileuszu uczestniczyli pracownicy obu instytucji, w kształtowaniu których Profesor D. Shugar uczestniczył od początku i w których nadal pracuje.

Tematyka Symposium, tak rozległa, jak rozległe są zainteresowania Jubilata, zorganizowana była w blokach tematycznych, w postaci serii półgodzinnych referatów. Wyjątkowo ciekawa sesja wieczorna, z refleksyjnym, spokojnym wystąpieniem Friedricha Cramera z Getyngi ("Emil Fischer's lock and key concept a hundred years ago and today") ukoronowała pierwszy dzień obraz poświęcony głównie chemicznym aspektom syntezy i strukturze analogów kwasów nukleinowych.

Naukową część tego dnia zaczął zresztą sam Profesor Shugar pasjonującym referatem (Untitled) poświęconym kinazom białkowym. Jeżeli ktoś miał jakiegokolwiek wątpliwości co do młodzieńczego temperamentu badawczego Profesora, to szybko je stracił słuchając z jaką pasją, świeżością spojrzenia i planami na przyszłość mówił o tych swoich ulubionych obiektach badań ostatnich lat.

Drugi dzień obrad objął tematykę bliższą enzymom i strukturze całych kwasów nukleinowych oraz mutagenzie, trzeci — chemioterapii chorób nowotworowych i wirusowych. Pozostał mi w pamięci niezwykle elegancki wykład Ephraima Katchalskiego-Katzira, sięgający także historycznych już Jego prac nad syntezą i właściwościami poliaminokwasów, jednocześnie wskazujący na ich znaczenie również w najnowocześniejszych odkryciach genetyki molekularnej (dynamiczne mutacje).

Trudno imiennie wyróżnić uczonych, w większości znanych nam z literatury, choć zawsze ciekawie jest zobaczyć jak wygląda ktoś, czyje prace od dawna się zna, z kim podejmowało się podobne problemy, a więc z kim łączy nas sposób myślenia. Rzucony na ekran obraz pierwszej strony mojej starej publikacji, stanowiącej odnośnik historyczny do współczesnych prac, sprawił mi dużą przyjemność.

Symposium miało również swoją część towarzyską: od małych spotkań „starych” przyjaciół w domach współpracowników Profesora i u Niego samego, przy wspaniałym przyjęciu w Hotelu Prezydenckim, z wielopiętrowym tortem podarowanym przez firmę A. Blikle, barokową muzyką chóralną w wykonaniu chłopięcego chóru Katedry Św. Jana i wystąpieniami przyjaciół z Polski i zagranicy, których prawdziwą ozdobą był poemat W. Guschlbauera, zaczynający się od słów "Eighty years ago was born a boy...", a kończący — "Long life to King David".

Zamknięcie bardzo pracowitego Symposium (34 referaty) uświetnił wspaniałym, ciepłym przemówieniem Ephraim Katchalski-Katzir. Przypomniał swoje kontakty i przyjaźń z Jubilatem, z poczuciem humoru opowiedział kilka anegdot i wzruszył nas wszystkich. Profesor Shugar otrzymał album zdjęć wykonanych w trakcie Symposium, z podpisami uczestników i gości. Nie zapewniliśmy jednego, na co skarżyli się wszyscy — pogody. Przez cały czas Symposium lał ulewny deszcz, który utrudniał zwiedzanie Warszawy i uczestnikom i osobom towarzyszącym.

W Sympozjum udział czynny wzięli (w kolejności wystąpień): D. Shugar (Warszawa), H. Vorbrüggen (Berlin), W. Pfeleiderer (Konstanz), F. Seela (Osnabrück), W. Stec (Łódź), Bożena Golankiewicz (Poznań), Karin Brinbaum (Ottawa), W. Saenger (Berlin), W. Guschlbauer (Gif-sur-Yvette), M. Wiewiórowski (Poznań), F. Cramer (Göttingen), J. S. Kwiatkowski (Toruń), G. V. Fazakerley (Gif-sur-Yvette), Jane K. Setlow (Upton), R. H. Haynes (North York), Celina Janion (Warszawa), R. Hancock (Quebec), G. E. Wright (Worcester), A. Krayevsky (Moskwa), W. Rode (Warszawa), Katarzyna Bębenek (Bethesda), N. G. Johnson (Huddinge), L. A. Pinna (Padova), R. Kole (Chapel Hill), E. De Clercq (Leuven), D. C-K. Chu (Georgia), Y. Becker (Jerusalem), K. Pankiewicz (New York), G. Gosselin (Montpellier), R. M. Tanguay (Ste-Foy), E. Katchalski-Katzir (Rehovot), V. Murthy (Ste-Foy), S. Caffieri (Padova).

Pełny program Sympozjum znajduje się w specjalnym, anglojęzycznym zeszycie „*Postępów Biochemii*”, dedykowanym Profesorowi Davidowi Shugarowi, a znaczna część referatów publikowana jest w „*Acta Biochimica Polonica*” vol. **43**, zeszyt 1, 1996.

Magdalena Fikus

## XXXI Zjazd Polskiego Towarzystwa Biochemicznego

### Sprawozdanie

W dniach 6-8 września 1995 r. miał miejsce w Warszawie XXXI Zjazd Polskiego Towarzystwa Biochemicznego. Obrady odbywały się w salach Auditorium Maximum Uniwersytetu Warszawskiego, plakaty zaś były wystawiane w salach Pałacu Staszica Polskiej Akademii Nauk. Honorowy patronat nad Zjazdem objęli prof. dr hab. Liliana Konarska, prezes Zarządu Głównego Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, prof. dr hab. Leszek Kuźnicki, prezes PAN, oraz Jego Magnificencja Rektor Uniwersytetu Warszawskiego, prof. dr hab. Włodzimierz Siwiński. Uroczyste otwarcie Zjazdu odbyło się w sali im. A. Mickiewicza w Auditorium Maximum UW. Uczestników Zjazdu i zaproszonych gości przywitała przewodnicząca Oddziału Warszawskiego PTBioch i Komitetu Organizacyjnego Zjazdu prof. dr hab. Barbara Grzelakowska-Sztabert, która też krótko przedstawiła zebranim problemy związane z organizacją Zjazdu. Następnie zabrali głos goście Zjazdu: prof. dr hab. Leszek Kuźnicki, prezes PAN, prof. dr hab. Maciej Nałęcz, dyrektor Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego i polskiej sieci Biologii Komórkowej i Molekularnej UNESCO/PAN oraz prof. dr hab. Bronisława Morawiecka, przewodnicząca zespołu Nauk Biologicznych, Nauk o Ziemi i Ochrony Środowiska Komitetu Badań Naukowych.

Po przemówieniach powitalnych zabrała głos profesor Liliana Konarska przedstawiając zebranim szereg wiadomości organizacyjnych z życia Towarzystwa Biochemicznego. Następnie pani Prezes wręczyła dyplomy i nagrody tegorocznym laureatom nagród Towarzystwa.

- im. J. Parnasa — A. Szalewskiej-Pałasz, A. Węgrzyn, A. Herman i G. Węgrzynowi za pracę pt. „The mechanism of the stringent control of lambda plasmid DNA replication” opublikowaną w *EMBO Journal*, 13, 5779-5785 (1994)
- im. B. Skarzyńskiego — dr Ewie Sikorze za artykuł pt. „Mechanizmy śmierci programowanej (apoptozy)”, opublikowany w „*Postęпах Biochemii*” **40**, 150-160, 1994.

Po oficjalnych wystąpieniach prof. dr hab. Maciej Żylicz z Akademii Medycznej w Gdańsku wygłosił wykład plenarny pt. „Białka szoku termicznego”.

Począwszy od południa 6 września obrady toczyły się w trzech równoległych blokach tematycznych. Pierwszy z nich, zatytułowany GENY I GENOMY, którego organizatorami byli prof. dr hab. Magdalena Fikus i prof. dr hab. Andrzej Jerzmanowski, obejmował 5 sesji

- replikacja DNA
- medycyna molekularna
- transkrypcja
- DNA — struktura i funkcja
- biologia molekularna roślin.

Drugi blok poświęcony był szeroko pojętej SYGNALIZACJI KOMÓRKOWEJ i zawierał 4 sesje:

- rola błon w regulacji procesów komórkowych  
(org. prof. dr Lech Wojtczak i prof. dr hab. Jerzy Duszyński)
- mechanizmy regulacji hormonalnej  
(org. prof. dr hab. Roman Lorenz)
- receptory komórkowe  
(org. prof. dr hab. Hanna Wehr i doc. dr hab. Barbara Czartoryska)
- przekaźnictwo sygnałów  
(doc. dr hab. Jolanta Barańska)

Blok trzeci o tematyce ukierunkowanej na ZAGADNIENIA MEDYCZNE obejmował 3 sesje i minisympozjum na temat biologii komórki nowotworowej sponsorowane przez polską sieć Biologii Molekularnej i Komórkowej UNESCO/PAN:

- procesy biotransformacji  
(org. prof. dr hab. Anna Barańczyk-Kuźma)
- mięśnie w normie i patologii  
(org. prof. dr hab. Renata Dąbrowska i doc. dr hab. Anna Jakubiec-Puka)
- biologia komórki nowotworowej  
(org. doc. dr hab. Małgorzata Balińska i doc. dr hab. Janusz Siedlecki, sponsor sieć Biologii Komórkowej i Molekularnej UNESCO).

Ponadto odbyła się sesja poświęcona nauczaniu biochemii, zorganizowana przez prof. dr hab. Zofię Walter. Oczywiście tematyka poszczególnych sympozjów ząbeiała się, zwłaszcza w sesjach poświęconych medycynie molekularnej i biologii komórki nowotworowej.

Każdego dnia prezentowano doniesienia różne, o tematyce zbliżonej do tematyki odbywających się w tym dniu sympozjów. Te doniesienia różne, które nie mieściły się w problemach poszczególnych sesji sklasyfikowano arbitralnie w grupy o zbliżonej tematyce. Streszczenia wykładów (65) wygłoszonych w poszczególnych sesjach oraz doniesienia zjazdowe (421) przygotowano do druku ze składu komputerowego i wydano w formie książkowej. Znalazły się też w nim reklamy (11) firm wystawiających na Zjeździe aparaturę, sprzęt i chemikalia niezbędne do badań. Wydano też program Zjazdu.

W czasie zjazdu przeprowadzono dwa konkursy. Pierwszy z nich to Konkurs im. Prof. Włodzimierza Mozołowskiego za najlepszą pracę przedstawioną na Zjeździe przez młodego biochemika (do 30 roku życia). Komisji konkursowej przewodniczył prof. L. Wojtczak, a laureatem konkursu, w którym uczestniczyło 19 osób została mgr Agnieszka Szablewska-Pałasz z Gdańska za prace „Niezdolność faga \ 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 \ w mutancie *Escherichia coli* rpoA341 nie zakłóca rozwoju litycznego faga”.

Ponadto przyznano 3 nagrody-wyróżnienia dla mgr Adama Sokala z Łodzi, mgr Grażyny Mosieniak z Warszawy, mgr Alicji Węgrzyn z Gdańska. Drugim konkursem był konkurs im. prof. Janiny Opieńskiej-Blauth za najlepszą prezentację przedstawioną przez autora-studenta, który w momencie przysłania streszczenia nie posiadał jeszcze dyplomu ukończenia studiów. W konkursie wzięło udział 11 osób, a komisja obradująca pod przewodnictwem prof. Tomasza Borkowskiego wyłoniła laureata — kol. Krzysztofa Kobiela z Poznania za pracę pt. „Podłoże molekularne zespołu Christ-Siemens-Touraine”. Ponadto wyróżniono kol. Dorotę Ścieglicką z Poznania, Dobrawę Lisicką z Poznania oraz Magdalenę Stańczyk z Warszawy.

Nagrody i wyróżnienia zostały wręczone przez prof. L. Konarską podczas uroczystości zakończenia Zjazdu.

W dniu otwarcia zjazdu uczestnicy spotkali się wieczorem na koncercie w Galerii Carroll-Porczyńskich, sponsorowanym przez firmę Perkin-Elmer. Spotkanie to zakończyło się miłą uroczystością złożenia przez prof. L. Konarską gratulacji z okazji 80-lecia urodzin długoletniemu redaktorowi *Postępów Biochemii*, prof. Z. Zielińskiej.

Część uczestników Zjazdu spotkała się również w restauracji *Adria*, niektórzy też zwiedzali *Żelazową Wolę*.

Drugiego dnia Zjazdu odbyło się walne zebranie członków Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, na którym wybrano nowe władze Towarzystwa. W kadencji 1995-1998 Prezesem ponownie została wybrana prof. Liliana Konarska.

Kończąc chciałobyśmy w imieniu organizatorów warszawskiego zjazdu bardzo serdecznie podziękować koleżankom i kolegom z Zakładów Biochemii Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego, członkom i sympatykom naszego Towarzystwa za wspierającą pomoc w dniach poprzedzających zjazd i w gorących dniach trwania zjazdu. Organizatorom XXXII Zjazdu w Krakowie życzymy samych sukcesów.

*Barbara Grzelakowska-Sztabert  
Katarzyna Nałęcz*

# S p r a w o z d a n i e

## z działalności Zarządu Głównego Polskiego Towarzystwa Biochemicznego XIV Kadencji 1992-1995 r.

W okresie sprawozdawczym liczba członków Polskiego Towarzystwa Biochemicznego zgrupowanych w 12 oddziałach terenowych zwiększyła się z 1488 osób w roku 1993 do 1607 osób w roku bieżącym (Tab. 1). W roku 1993, 1994 i pierwszej połowie roku 1995 przyjęto 25, 55 i 27 Członków Rzeczywistych i 22, 27 i 31 Członków Studentów (Tab. 2). Członków, którzy z różnych powodów zalegali ponad 2 lata z płacaniem składem przeniesiono w poczet tzw. Członków biernych, tracących jednocześnie część przywilejów, jak ulgi w prenumeracie „*Postępów Biochemii*”, opłacie za uczestnictwo w zjazdach itp. Liczba Członków biernych stale wzrasta i w roku sprawozdawczym wynosi aż 459 osób. Pozostali Członkowie Towarzystwa płacą składkę regularnie. Jej wysokość w minionej kadencji wynosiła kolejno 40.000 starych zł. w latach 1992 i 1993, 100.000 starych zł. w roku 1994 i 15 zł. od 01.03.1995. Składka Członków Studentów wynosi 5 zł.

Zarząd Główny, przy współpracy z Zarządami Oddziałów, prowadzi 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 biurze Zarządu Głównego, które w roku 1993 zostało przeniesione z ciasnego pomieszczenia przy ul. Freta 16 do nowej siedziby w budynku Instytutu Biologii Doświadczalnej PAN im. M. Nenckiego przy ul. Pasteura 3 (pokój 633). Dzięki temu poprawiły się warunki pracy Zarządu i możliwości kontaktu z Oddziałami terenowymi i ośrodkami naukowymi w kraju i zagranicą (tel: 658-20-99, fax: 22-53-42). Biuro Zarządu Głównego oraz redakcje „*Acta Biochimica Polonica*” i „*Postępów Biochemii*” są teraz zlokalizowane w jednym miejscu co usprawnia pracę i daje możliwość znacznych oszczędności przez korzystanie ze wspólnego pomieszczenia i sprzętu (komputer, kserokopiarka). Zarząd Główny dysponuje już komputerem i odpowiednim programem, który pozwoli na prowadzenie elektronicznej ewidencji Członków Towarzystwa. Ułatwi to z pewnością pracę sekretariatu Zarządu Głównego następnych kadencji.

W okresie sprawozdawczym działalność Towarzystwa — wydawnictwa, zjazdy, sympozja naukowe i szkolenia dotowane były przez Komitet Badań Naukowych. Wpływy z tytułu składek członkowskich powinny

**Tabela 1.**

Liczba członków Polskiego Towarzystwa Biochemicznego w latach 1993-1995

Oddział	1993	1994	1995
Białystok	48	50	54
Gdańsk	78	78	88
Katowice	96	98	83
Kraków	91	91	93
Lublin	95	101	105
Łódź	158	157	161
Olsztyn	48	48	54
Poznań	165	117	171
Szczecin	50	51	50
Toruń	32	32	32
Warszawa	510	552	590
Wrocław	117	123	126
<b>Ogółem</b>	<b>1488</b>	<b>1552</b>	<b>1607</b>
(zawieszeni, bierni)	(236)	(380)	(459)



Tabela 2.

	Członkowie przyjęci do PTBioch w roku:					
	1993	W tym studenci	1994	W tym studenci	1995 do 30.06.95	W tym studenci
Białystok	3	1	2	–	3	1
Gdańsk	3	1	10	2	–	–
Katowice	3	–	3	1	1	–
Kraków	–	–	2	–	–	–
Lublin	3	–	7	1	4	2
Łódź	2	2	3	1	12	8
Olsztyn	–	–	–	–	6	1
Poznań	2	–	5	–	1	–
Szczecin	1	–	–	–	–	–
Toruń	–	–	–	–	–	–
Warszawa	29	18	38	19	27	17
Wrocław	1	–	12	3	4	2
<b>Razem</b>	<b>47</b>	<b>22</b>	<b>82</b>	<b>27</b>	<b>58</b>	<b>31</b>

wynosić około 50 mln, w latach 1992 i 1993, i 150 mln w latach 1994/1995, przy założeniu, że wszyscy Członkowie Towarzystwa płacą regularnie składki. W rzeczywistości mogliśmy liczyć na składki płacone regularnie przez 30-50% Członków Towarzystwa. Z tych skromnych funduszy pokrywane były najniezbędniejsze wydatki Zarządu (opłata dwóch urzędniczek, księgowej, składki FEBS, doroczne nagrody, przesyłki itp.).

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

- działalność wydawniczą: „*Postępy Biochemii*”, „*Acta Biochimica Polonica*” i Monografie
- premiowanie najwartościowszych osiągnięć naukowych, a ostatnio i dydaktycznych, poprzez konkursy i nagrody
  - im. prof. Jakuba
  - im. prof. Bolesława Skarżyńskiego
  - im. prof. Włodzimierza Mozołowskiego
  - im. prof. Janiny Opieńskiej-Blauth
  - im. prof. Antoniego Dmochowskiego
- 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 organizacją nauczania poprzez wymianę doświadczeń dydaktycznych oraz przygotowania pomocy ułatwiających pracę nauczycieli akademickich i licealnych
- integrację środowiska biochemicznego poprzez redakcję „*Listów do Członków Towarzystwa*”.

## Działalność wydawnicza

**Kwartalnik „*Postępy Biochemii*”** rozwija się pomyślnie. W XIV Kadencji redaktor naczelny prof. Zofia Zielińska oraz pozostali redaktorzy — prof. Grażyna Palamarczyk, prof. Andrzej Jerzmanowski i dr Anna Szakiel dbali o punktualne ukazywanie się pisma oraz wysoki merytoryczny i graficzny poziom drukowanych artykułów. Prezentowane prace zawierają wiedzę o współczesnych kierunkach badań nauk biologicznych, przybliżają najnowsze osiągnięcia światowych pracowni. „*Postępy Biochemii*” w obecnej formie dostarczają aktualnych informacji z wielu pokrewnych dziedzin, takich jak biochemia, biologia

Tabela 3.

Oddział	Prenumerata „Postępów Biochemii” w roku:		
	1993	1994	1995 (do 15 VII 95)
Białystok	12	12	8
Gdańsk	12	15	15
Toruń	6	2	7
Kraków	24	26	13
Katowice	30	28	23
Lublin	33	33	35
Łódź	33	37	37
Olsztyn	10	6	8
Poznań	19	15	11
Szczecin	24	13	14
Warszawa	56	65	53
Wrocław	25	23	12
<b>Razem</b>	<b>284</b>	<b>275</b>	<b>236</b>

molekularna, genetyka, biotechnologia oraz nauki medyczne. Kwartalnik jest cennym uzupełnieniem podręczników akademickich. Stanowi on pomoc w nauczaniu studentów wydziałów biologicznych Uniwersytetów, Akademii Rolniczych, Akademii Medycznych i Politechnik. Kwartalnik jest dotowany przez KBN i dzięki temu może ukazywać się regularnie i w nowoczesnej formie. Wpływy ze sprzedaży są coraz mniejsze, ponieważ liczba osób prenumerujących to czasopismo systematycznie spada (284 w 1993 roku do 236 w roku 1995, Tab. 3). Stale prowadzona jest sprzedaż pojedynczych numerów i całych roczników kwartalnika w Zarządzie Głównym i podczas zjazdów i sympozjów organizowanych przez PTBioch. Część egzemplarzy rozprowadzana jest nieodpłatnie wśród nowoprzyjmowanych członków i jako egzemplarze reklamowe.

**Kwartalnik „Acta Biochimica Polonica”** publikuje oryginalne prace doświadczalne w języku angielskim. Kwartalnik redagowany jest przez 9-cio osobowy zespół. Redaktorem naczelnym jest prof. Konstancja R a c z y Ń s k a - B o j a n o w s k a, a 18-osobowej Radzie Redakcyjnej przewodniczy prof. Lech W o j t c z a k. Od grudnia 1992 roku czasopismo jest wydawane przez Polskie Towarzystwo Biochemiczne wspólnie z Komitetem Biochemii i Biofizyki PAN. W roku 1993 zmieniono format, unowocześniono szatę graficzną pisma i przeniesiono redakcję z pomieszczeń PAN w PKiN do pomieszczenia sąsiadującego z siedzibą Zarządu Głównego. Kwartalnik jest wydawany z pomocą finansową KBN, co zapewnia regularne ukazywanie się czasopisma. Dzięki temu „Acta Biochimica Polonica”, po 1,5-rocznym braku indeksacji powróciły do Current Contents. Czasopismo to indeksowane jest także w BIOSIS, Chemical Abstracts, Excerpta Medica, Medline.

## Monografie Biochemiczne

Z inicjatywy Sekcji Dydaktycznej Towarzystwa kontynuowano wydawanie monografii. W 1993 r. ukazało się drugie wydanie monografii pt. „Rozpad fosfolipidów a przekazywanie informacji w komórce” (uzupełnione i rozszerzone) — autor Jolanta B a r a Ń s k a. Ukazała się również kolejna pozycja „Budowa i funkcja błon” autorstwa W. L e ś n i a k i Z. P o r e m b s k i e j.

W 1995 roku zostaną wydane dwie kolejne pozycje:

— „Molekularne mechanizmy przekazywania sygnałów w komórce” — praca zbiorowa pod red. L. K o n a r s k i e j opracowane na podstawie materiałów wykładowych Szkoły Zimowej nt. „Przekazywanie Sygnałów w Komórce”, zorganizowanej przez Zarząd Główny Polskiego Towarzystwa Biochemicznego w grudniu 1993 r., wydawca PWN.

— „Włodzimierz Mozołowski. W stulecie urodzin „Monografia opracowana przez prof. W. M a k a r e w i c z a, wydawca Oddział Gdański Polskiego Towarzystwa Biochemicznego.

— W przygotowaniu jest monografia pt. „Hormony glikoproteinowe: struktura, biosynteza i funkcja ich oligosacharydów” Autorzy: Iwona Ż a k i Marian D r ó ź d. Wydawca: Zarząd Główny PTBioch.

Publikacje zawierają najnowsze informacje dotyczące omawianych tematów. Stanowią cenne uzupełnienie przestarzałych podręczników akademickich. Mogą z nich korzystać zarówno wykładowcy i asystenci jak i studenci.

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 XIV Kadencji ukazało się 11 listów informujących o działalności naszego Towarzystwa. Biuletyn przekazuje aktualne wiadomości dotyczące pracy Zarządu Głównego, pracy Oddziałów oraz informuje o naukowych imprezach w kraju i zagranicą. 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 Parnasa za najlepszą pracę doświadczalną z zakresu biochemii wykonaną w pracowni na terenie Polski jest przyznawana regularnie. W okresie sprawozdawczym otrzymali ją:

- Grzegorz Węgrzyn, Alicja Pawłowicz i Karol Taylor w 1993 roku
  - Hanna Strzelecka-Gołaszewska, Joanna Moraczewska, Sofia Knaitlina i Małgorzata Mossakowska w 1994 roku
  - Agnieszka Szalewska-Pałasz, Alicja Węgrzyn, Anna Herman i Grzegorz Węgrzyn w 1995 roku.
- Konkurs mógł się odbywać dzięki pracy wielu osób, które wchodziły w skład komisji w kolejnych latach 1993—1995, byli to:

### **Przewodniczący:**

- |                             |                 |
|-----------------------------|-----------------|
| 1. Prof. Lech Wojtczak      | (1993) Warszawa |
| 2. Prof. Andrzej Guranowski | (1994) Poznań   |
| 3. Prof. Jan Barciszewski   | (1995) Poznań   |

### **Członkowie:**

- |                                     |                  |
|-------------------------------------|------------------|
| 1. Prof. Andrzej Guranowski         | (1993) Poznań    |
| 2. Prof. Włodzimierz Korohoda       | (1993) Kraków    |
| 3. Prof. Wiesław Makarewicz         | (1993) Gdańsk    |
| 4. Prof. Hanna Wehr                 | (1993) Warszawa  |
| 5. Prof. Włodzimierz Zgórski-Ostoja | (1993) Warszawa  |
| 6. Prof. Zbigniew Żak               | (1993) Kraków    |
| 7. Prof. Jan Barciszewski           | (1994) Poznań    |
| 8. Prof. Tadeusz Chojnacki          | (1994) Warszawa  |
| 9. Dr Michał Komoszyński            | (1994) Toruń     |
| 10. Prof. Barbara Lipińska          | (1994) Gdańsk    |
| 11. Prof. Roman Tarnawski           | (1994) Katowice  |
| 12. Doc. Jolanta Barańska           | (1995) Warszawa  |
| 13. Prof. Andrzej Bierzyński        | (1995) Warszawa  |
| 14. Prof. Teresa Jakubowicz         | (1995) Lublin    |
| 15. Prof. Zofia Kiliańska           | (1995) Łódź      |
| 16. Prof. Henryk Lach               | (1995) Kraków    |
| 17. Prof. Ryszard Oliński           | (1995) Bydgoszcz |
| 18. Prof. Anna Podhajska            | (1995) Gdańsk    |
| 19. Dr Jolanta Zakrzewska           | (1995) Wrocław   |

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

- Mirosława Barciszewska, Jan Barciszewski 1993
- Andrzej Kutner 1994
- Ewa Sikora 1995

W skła komisji konkursowej wchodzili:

### **Przewodniczący:**

- |                               |                 |
|-------------------------------|-----------------|
| 1. Prof. Grażyna Palamarczyk  | (1993) Warszawa |
| 2. Prof. Andrzej Jerzmanowski | (1994) Warszawa |
| 3. Prof. Zofia Zielińska      | (1995) Warszawa |

**Członkowie:**

1. Prof. Tomasz Borkowski (1993) Lublin
2. Prof. Wanda Dobryczycka (1993) Warszawa
3. Prof. Andrzej Jerzmanowski (1993) Warszawa
4. Prof. Maciej Żylicz (1993) Gdańsk
5. Prof. Barbara Grzelakowska-Sztabert (1994) Warszawa
7. Prof. Anna Lipińska (1994) Łódź
8. Prof. Anna Podhajska (1994) Gdańsk
9. Doc. Ksenia Bykowska (1995) Warszawa
10. Prof. Wojciech Markiewicz (1995) Poznań
11. Prof. Irena Pietrzykowska (1995) Warszawa
12. Doc. Janusz Siedlecki (1995) Warszawa
13. Prof. Zdzisław A. Wojciechowski (1995) Warszawa

W konkursie im. prof. Włodzimierza Mozołowskiego na najlepszą pracę młodych biochemików (do lat 30) przedstawianą na corocznych Zjazdach Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, nagrodzeni zostali:

- Katarzyna Lisowska (nagroda)
- Małgorzata Czarny (wyróżnienie)
- Anna Filipek (wyróżnienie)
- Bernard Korzeniowski (wyróżnienie) w 1993 r.
- W. G. Musiał (nagroda)
- Sławomir Dąbrowski (wyróżnienie)
- Barbara Niewczas (wyróżnienie) w 1994 r.
- Agnieszka Szalewska-Palasz (nagroda)
- Marta Prymakowska-Bosak (wyróżnienie)
- Grażyna Mosieniak (wyróżnienie)
- A. Sokal (wyróżnienie)
- Alicja Węgrzyn (wyróżnienie) w 1995 r.

W skład komisji konkursowych wchodził:

**Przewodniczący:**

1. Prof. Janina Kwiatkowska-Korczak (1993) Wrocław
2. Prof. Jadwiga Purzycka-Preis (1994) Gdańsk
3. Prof. Lech Wojtczak (1995) Warszawa

**Członkowie:**

1. Prof. Liliana Konarska (1993) Warszawa
2. Prof. Aleksandra Kubicz (1993) Wrocław
3. Doc. Danuta Kwiatkowska (1993) Wrocław
4. Prof. Mariusz Żydowo (1993) Gdańsk
5. Prof. Liliana Konarska (1994) Warszawa
7. Prof. Wiesław Makarewicz (1994) Gdańsk
8. Prof. Tomasz Tyrakowski (1994) Szczecin
9. Prof. Halina Augustyniak (1995) Poznań
10. Prof. Ewa Bartnik (1995) Warszawa
11. Prof. Andrzej Jerzmanowski (1995) Warszawa
12. Prof. Mariusz Żydowo (1995) Gdańsk

Od 1994 roku przyznawana jest dodatkowo nagroda im. prof. Janiny Opieńskiej-Blauth za szczególnie wartościowe prace badawcze, zgłoszone i przedstawione na Zjeździe PTBioch przez studentów.

Otrzymali je w 1994 r.:

I nagrodę: Anna Herman  
3 równorzędne II nagrody: Maciej Król  
Sławomir Majdanik  
Aleksandra Rojek

W 1995 r.:

Nagroda: Krzysztof Kobiela  
Wyróżnienie: Dorota Ściegłińska  
Wyróżnienie: Dobra Lisięcka  
Wyróżnienie: Magdalena Stańczyk

W skład komisji konkursowej wchodził:

**Przewodniczący:**

1. Prof. Tomasz Borkowski (1994, 1995) Lublin

**Członkowie:**

1. Doc. Jolanta Barańska (1994) Warszawa  
2. Prof. Liliana Konarska (1994) Warszawa  
3. Prof. Zygmunt Machoy (1994) Szczecin  
4. Dr Maria Sanecka-Obacz (1994) Lublin  
5. Dr Teresa Wesołowska (1994) Szczecin  
6. Prof. Jerzy Duszyński (1995) Warszawa  
7. Dr Maria Sanecka-Obacz (1995) Lublin  
8. Prof. Roman Tarnawski (1995) Katowice  
9. Dr Teresa Wesołowska (1995) Szczecin

Nagrodę za najlepszą prezentację posteru na XXX Zjeździe PTBioch w Szczecinie, ufundowaną przez firmę M&C Lab. otrzymali:

— E. Poremba, A. Goździcka-Józefiak, H. Kędzia

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

**Konkurs na najlepiej przygotowany i wygłoszony wykład akademicki**

Od 6 lat odbywają się konkursy na najlepiej przygotowany i wygłoszony wykład z dziedziny nauk biologicznych, biochemii i biologii molekularnej. Organizacja Konkursów ma na celu popularyzację osiągnięć nauk biologicznych.

W 1993 roku w finale konkursu wygłoszono 4-y wykłady:

1. Katarzyna Anna Nałęcz: „Mechanizmy transportu związków niskocząsteczkowych przez błony biologiczne”  
2. Maciej Szymański: „Mechanizmy inicjacji odwrotnej transkrypcji wirusa HIV-1”  
3. Małgorzata Giel: „Strukturalne aspekty oddziaływania białek z DNA”  
4. Lucyna Pawłowska-Ćwięk: „Mechanizmy detoksykacji dwutlenku siarki i skutki niewydolności jego unieszkodliwienia”.

Komisja Konkursowa przyznała jedną pierwszą (1), dwie drugie (2, 3) i jedną trzecią Nagrodę (4).

W 1994 roku dwie równorzędne pierwsze Nagrody uzyskali:

- Janusz Siedlecki za wykład: „Molekularne podstawy chorób nowotworowych”  
— Adam Szewczyk: „ATP-wewnątrzkomórkowy przekaźnik informacji”

Dwie równorzędne drugie Nagrody uzyskali:

- Mirosława Siatecka za wykład: „Struktura i właściwości syntetaz aminoacylo-tRNA”  
— Eliza Wyszko: „Struktura i właściwości czynnika transkrypcyjnego IIIA (TF III A) *Xenopus levis*”

W roku 1995 Konkurs nie odbył się z powodu braku zgłoszeń.

**Ważniejsze uchwały Organów Statutowych Towarzystwa w 1992 roku:**

1. Przejęcie przez Polskie Towarzystwo Biochemiczne kwartalnika „*Acta Biochimica Polonica*”. Dawny wydawca: Komitet Biochemii i Biofizyki PAN, pozostaje współwydawcą.  
2. Zatwierdzenie planu Zjazdów Towarzystwa w roku 1994 (Szczecin) i 1995 (Warszawa).

**w 1993 roku:**

1. Podwyższenie rocznej składki członkowskiej z 40.000 zł. w 1992 i 1993 roku do 100 000 zł. poczynając od 1994 roku.  
2. Powołanie Sekcji Biotechnologii  
Przewodniczący — prof. Stanisław Bielecki (Łódź)  
Członkowie — prof. Tomasz Twardowski (Poznań)  
— prof. Antoni Polanowski (Wrocław)  
— dr hab. Marianna Turkiewicz (Łódź)  
3. Decyzja o przeniesieniu siedziby Zarządu Głównego z ul. Freta 16 do budynku Instytutu Biologii Doświadczalnej PAN im. M. Nenckiego przy ul. Pasteura 3.

## w 1994 roku:

1. Podwyższenie składki członkowskiej w roku 1995 z 190 zł. do 15 zł. Członkowie Studenci płacą 5 zł.
2. Powołanie Konkursu i zatwierdzenie regulaminu Nagrody im. prof. Janiny Opieńskiej-Bluth, na wniosek Lubelskiego Środowiska Biochemicznego. Nagroda jest przyznawana studentom za szczególnie wartościowe prace badawcze, zgłoszone i przedstawione na dorocznym Zjeździe Towarzystwa.
3. Powołanie Konkursu i zatwierdzenie regulaminu Nagrody im. prof. Antoniego Dmochowskiego, która przyznawana będzie co 2 lata za szczególne osiągnięcia dydaktyczne w dziedzinie biochemii. Pierwsza edycja Konkursu zostanie rozstrzygnięta w 1996 roku.

## w 1995 roku:

1. Ustalenie i zatwierdzenie planu Zjazdów PTBioch w roku 1996 (Kraków) i 1997 (Katowice).
2. Zgłoszenie Sekcji Biotechnologii Polskiego Towarzystwa Biochemicznego na członka Europejskiej Federacji Biotechnologii.
3. Zgłoszenie kandydatury prof. M. J. Nałęcza do Komitetu Kursów FEBS.

## Działalność Organizacyjno-Naukowa Towarzystwa

### 1. Zjazdy Polskiego Towarzystwa Biochemicznego

W bieżącej Kadencji odbyły się trzy Zjazdy PTBioch:

- Wrocław 1993
- Szczecin 1994
- Warszawa 1995

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. Monotematyczne sesje naukowe

- Szkoła Zimowa na temat „Przekazywanie sygnałów w komórce”

W celu udostępnienia najnowszych osiągnięć nauki światowej w dziedzinie regulacji procesów komórkowych, Zarząd Główny zorganizował Szkołę Zimową dla asystentów i młodszych pracowników nauki na temat „Przekazywanie sygnałów w komórce”.

Odbyły się następujące wykłady:

- Budowa i funkcja błon
- Molekularne mechanizmy transportu
- Receptory, klasyfikacja i funkcja
- Receptory czynników wzrostu, budowa i funkcja
- Budowa i funkcja białek G
- cAMP i cGMP — wtórne przekaźniki informacji
- Udział pochodnych inozytoli w przekazywaniu informacji
- Wapń — wtórny przekaźnik sygnałów
- Biosynteza i fizjologiczna funkcja tlenu azotu
- Sygnały indukujące programowaną śmierć komórki

Udział w zajęciach wzięło 140 osób. Słuchacze potwierdzili dobry merytoryczny poziom wykładów i wyrazili potrzebę podobnych konferencji kształceniowych w przyszłości. Materiały wykładowe stały się przyczynkiem do książki, która ukaże się nakładem PWN w IV kwartale 1995 roku.

— Kurs „Analiza glikokoniugatów” prowadzony w całości w języku angielskim jako „Glycobiology Workshop, Białystok'93” (22-28 sierpnia 1993). Zorganizowany przez Białostocki Oddział Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, Instytut Glikobiologii Uniwersytetu w Oxfordzie, Oxford Glycosystems i Zakład Biochemii Farmaceutycznej AM w Białymstoku.

W kursie wzięło udział 28 uczestników z Polski, Estonii, Białorusi i Ukrainy. Zajęcia prowadziło 6 wykładowców z Wielkiej Brytanii i 2 z Polski.

Celem kursu było zapoznanie się z podstawowymi zasadami glikobiologii i znaczeniem glikozylacji w formowaniu struktury i funkcji glikoprotein. Wykłady były zintegrowane z zajęciami praktycznymi — tj. najnowszymi metodami uwalniania i określania struktury oligosacharydów. Kurs był dotowany przez KBN.

— „Advanced Course on Applied Biocatalysis” Zakopane, 16-20 maj 1994. Kurs zorganizowany był przez

Sekcję Biotechnologii Polskiego Towarzystwa Biochemicznego i Politechnikę Łódzką. Połączony był z 32 Spotkaniem Grupy Roboczej Biokatalizy Stosowanej Europejskiej Federacji Biotechnologii. Zarząd Główny PTBioch otrzymał oficjalne pisemne podziękowanie za doskonałą organizację i wysoki poziom merytoryczny kursu podpisane przez sekretarza Grupy Roboczej dr Fernando A. Garcia.

— W roku 1994 Polskie Towarzystwo Biochemiczne było współorganizatorem wraz z Polską Siecią Biologii Komórkowej i Molekularnej UNESCO/PAN następujących kursów i sympozjów dotowanych przez KBN:

- Międzynarodowe Sympozjum nt. „Macierz jądrowa”, Wrocław, czerwiec 1994
- Sympozjum nt. „Molekularne i fizjologiczne aspekty regulacji ustrojowej”, Kraków, 7-8 czerwiec 1994
- Międzynarodowa Szkoła Biofizyki Transportu Membranowego, Zakopane, 4-13 maj 1994
- Kurs szkoleniowy: „Wybrane techniki molekularne”, Poznań, 13-16 grudzień 1994

— Sesja n.t. „Biologia molekularna i inżynieria genetyczna w agrobiotechnologii”, Poznań, 18 września 1995 organizowana przez Sekcję Biotechnologii Polskiego Towarzystwa Biochemicznego i dotowana przez KBN.

Sesja ta została zaplanowana jako wprowadzenie do międzynarodowej konferencji „Agrobiotechnology”, Poznań, 17-20 wrzesień 1995, organizowanej przez Instytut Chemii Bioorganicznej PAN, Akademię Rolniczą w Poznaniu, Instytut Zootechniki w Krakowie, Instytut Genetyki i Hodowli Zwierząt w Jastrzębcu i Sekcję Biotechnologii PTBioch.

### 3. Spotkania wykładowców biochemii i biochemii klinicznej

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

- w Poznaniu — organizowane przez prof. Halinę Karoń (1993)
- w Warszawie — organizowane przez prof. Bogdana Szukalskiego (1994)
- w Gdańsku — organizowane przez prof. Mariusza Żydowo (1995)

Tematem Konferencji były programy nauczania biochemii i biologii molekularnej w Uczelniach Medycznych w Polsce i Europie.

**Tabela 4.**

Liczba członków Polskiego Towarzystwa Biochemicznego korzystających z kursów i stypendiów FEBS w latach 1992-1994

	1992	1993	1994
Advanced courses and youth travel found	15	12	13
Short-term fellowships	3	2	1
Summer fellowships	–	1	1
Long-term fellowships	–	1	2
<b>łącznie</b>	<b>18</b>	<b>16</b>	<b>17</b>

## Staże Naukowe

Staże naukowe są gorąco popierane przez Zarząd Główny Polskiego Towarzystwa Biochemicznego. Członkowie naszego Towarzystwa brali udział w wielu krajach 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 16-18 osób (Tab. 4).

## 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 znalazł się we władzach FEBS. Podczas 34 Zebrania Rady FEBS w Bazylei, 16.08.1995, prof. Maciej J. Nałęcz został jednogłośnie przyjęty na członka FEBS Advanced Courses Committee.

2. Polskie Towarzystwo Biochemiczne jest także członkiem (status „adhering body”) Międzynarodowej Unii Biochemii i Biologii Molekularnej (IU BMB).

3. W roku 1995 Sekcja Biotechnologii Polskiego Towarzystwa Biochemicznego została przyjęta w poczet Członków Europejskiej Federacji Biotechnologii.

## Ogólna Ocena Pracy w XIV Kadencji

Miniona, XIV Kadencja władz Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, niezależnie od obiektywnych trudności, przebiegała pomyślnie. Odkonano wiele interesujących imprez naukowych, dydaktycznych, uzyskano niezaprzeczalne sukcesy wydawnicze. Niewątpliwym osiągnięciem było przeniesienie biura Zarządu i redakcji *Acta Biochimica Polonica* do nowej siedziby na terenie Instytutu Biologii Doświadczalnej PAN im. M. Nenckiego gdzie mieści się również redakcja *Postępów Biochemii* oraz przyjęcie przedstawiciela naszego Towarzystwa do władz FEBS oraz Sekcji Biotechnologii Polskiego Towarzystwa Biochemicznego do Europejskiej Federacji Biotechnologii. Wszystkie te poczynania doprowadziły do większej integracji naszego biochemicznego środowiska. Dzięki entuzjazmowi i zaangażowaniu w prawdziwie bezinteresowną pracę społeczną naszych koleżanek i kolegów udało się zrealizować wiele inicjatyw i akcji na rzecz rozwoju naszej dyscypliny, co jest Statutowym celem Polskiego Towarzystwa Biochemicznego.

Wszystkim członkom Zarządu Głównego, a w szczególności doc. Jolancie Barańskiej i prof. Edwardowi Bańkowskiemu, 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 polskiej społeczności biochemicznej.

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

Warszawa, 7 września 1995

## Protokół z XV Zwyczajnego WALNEGO ZEBRANIA członków Polskiego Towarzystwa Biochemicznego Warszawa, dnia 07.09.1995 r.

### Porządek Dzienny

1. Otwarcie Walnego Zebrania.
2. Wybór Przewodniczącego i Sekretarza Walnego Zebrania.
3. Powołanie Komisji Matki, Komisji Skrutacyjnej i Komisji Wniosków.
4. Przejęcie protokołu z poprzedniego, XIV Walnego Zebrania w dniu 18.09.1992 (wyciąg z protokołu zamieszczony został w „*Postęпах Biochemii*”, 1993, 39 (1), 75-77)
5. Sprawozdanie z działalności ustępującego Zarządu Głównego XIV kadencji.
6. Sprawozdanie komisji Rewizyjnej.
7. Dyskusja nad sprawozdaniami i wniosek o absolutorium dla ustępującego Zarządu.
8. Wybory nowych władz Towarzystwa.
9. Nadanie godności członków honorowych Towarzystwa  
*prof. Zygmuntowi Machoyowi*  
*prof. Lechowi Wojtczakowi*  
*prof. Tadeuszowi Reichsteinowi*
10. Dyskusja na temat dotychczasowej i przyszłej działalności Towarzystwa.
11. Wolne wnioski.

Zebranie rozpoczęło się w drugim terminie o godz. 17.00.

Zebranie protokołowała *dr Bożenna Sadurska*.

ad. 1.2. Zebranie otworzyła Prezes Towarzystwa *prof. Liliana Konarska* proponując na przewodniczącego zebrania *prof. Tomasza Borkowskiego*. Po przyjęciu kandydatury przez aklamację, przewodniczący zebrania powołał *dr Bożennę Sadurską* na sekretarza zebrania.

ad 3. *Prof. T. Borkowski* zaproponował powołanie:

a) Komisji Matki, w skład której weszli: *prof. Janina Kwiatkowska-Korczak*, *prof. Jadwiga Purzycka-Preis* i *prof. Wiesław Trzeciak*.



b) Komisji Skrutacyjnej, w skład której weszli: *prof. Anna Lipińska* jako przewodnicząca oraz *mgr Magdalena Wiktoresk* i *mgr Justyna Steinbrich* jako członkowie.

c) Komisji Wniosków, w skład której weszli: *prof. Zofia Zielińska* i *prof. Andrzej Jerzmanowski*.

ad 4. Przewodniczący zebrania zaproponował przyjęcie protokołu z poprzedniego XIV Walnego Zebrania przez aklamację na podstawie wyciągu z protokołu zamieszczonego w „Postępach Biochemii”, 1993, 39 (1) 75-77. Zgromadzeni jednogłośnie poparli tę propozycję.

ad. 5. *Prof. Liliana Konarska* przedstawiła obszerne sprawozdanie z działalności Zarządu Głównego XIV Kadencji obejmującej lata 1992-1995. Dyskusji nad sprawozdaniem nie było.

ad. 6.7. *Prof. Magdalena Fikus* odczytała następnie sprawozdanie Komisji Rewizyjnej. Komisja podkreśliła w nim znaczącą i różnorodną statutową działalność Zarządu Głównego XIV Kadencji. Wniosek Komisji o udzielenie absolutorium ustępującemu Zarządowi zebrani przyjęli przez głosowanie, przy jednym głosie wstrzymującym się.

ad 8. W tajnym głosowaniu do Zarządu Głównego PTBioch na XV Kadencję zostali wybrani:

1. Prezes PTBioch — *prof. Liliana Konarska* (Warszawa)
2. Wiceprezes PTBioch — *doc. Jolanta Barańska* (Warszawa)
3. *doc. Małgorzata Balińska* (Warszawa)
4. *prof. Edward Bańkowski* (Białystok)
5. *prof. Stanisław Bielecki* (Łódź)
6. *prof. Jan Glogowski* (Olsztyn)
7. *prof. Teresa Jakubowicz* (Lublin)
8. *prof. Aleksandra Kubicz* (Wrocław)
9. *doc. Piotr Laidler* (Kraków)
10. *prof. Maciej J. Nałęcz* (Warszawa)
11. *prof. Ryszard Oliński* (Bydgoszcz)
12. *prof. Jerzy Popinigis* (Gdańsk)
13. *prof. Zofia Poremska* (Warszawa)
14. *prof. Roman Tarnawski* (Katowice)
15. *prof. Tomasz Twardowski* (Poznań)
16. *dr Teresa Wesółowska* (Szczecin)

Do Komisji Rewizyjnej zostały wybrane:

1. *prof. Jolanta Barańczyk-Kuźma* (Warszawa)
2. *prof. Magdalena Fikus* (Warszawa)
3. *prof. Marta Stryjecka-Zimmer* (Lublin)

ad 9. W uznaniu zasług dla rozwoju Biochemii Polskiej *prof. Liliana Konarska* w imieniu ZG PTBioch zgłosiła kandydatury na Członków Honorowych Polskiego Towarzystwa Biochemicznego: *prof. Zygmunta Machoya*, *prof. Lecha Wojtczaka* oraz *prof. Tadeusza Reichsteina*. Sylwetki nowych kandydatów na Członków Honorowych Towarzystwa przedstawiła *doc. Jolanta Barańska*. Sylwetki tych znakomitych kandydatów uzupełnili w swoich wypowiedziach: *dr Teresa Wesółowska* — w przypadku *prof. Z. Machoya*, *prof. Liliana Konarska* i *prof. Jerzy Popinigis* — w przypadku *prof. L. Wojtczaka* oraz *prof. Marek Gniazdowski* — w przypadku *prof. T. Reichsteina*. Ponadto zebrani obejrzeli film o życiu, działalności naukowej i związków z Polską *prof. T. Reichsteina*. W tajnym głosowaniu wszyscy zgłoszeni kandydaci zostali wybrani jednomyślnie.

ad 10. *Prof. Żbikowski* z Instytutu Biochemii i Biofizyki poruszył sprawę wypadnięcia polskiego czasopisma *Acta Biochimica Polonica* z *Current Contents*. Nawiązując do powyższej wypowiedzi *prof. Nałęcz* wyjaśnił, że było to spowodowane nieregularnym ukazywaniem się kwartalnika na skutek drastycznego zmniejszenia środków finansowych na naukę w ostatnich latach. Dzięki wysiłkom redaktora *prof. Konstancji Raczyńskiej-Bojanowskiej*, całej Redakcji kwartalnika i ZG PTBioch jako wydawcy, *Acta Biochimica Polonica* od połowy 1995 r. są ponownie cytowane w *Current Contents*. *Dr Teresa Wesółowska* zwróciła się do zebranych o liczny udział w współtworzeniu biuletynu informacyjnego PTBioch t.j. „Listów”. Spotkało się to z dużą przychylnością zebranych, a głos w tej sprawie zabrali: *prof. Magdalena Fikus* i *prof. Tomasz Twardowski*.

ad 11. Wolnych wniosków zebrani nie zgłaszali. Zamykając o godz. 20.00 XV Zwyczajne Walne Zebranie PTBioch *prof. T. Borkowski* podziękował wszystkim uczestnikom za udział.

Przewodniczący Zebrania

Protokołowała

*Bożenna Sadurska*

*Tomasz Borkowski*

# Nowe Władze Towarzystwa

Wybrany w dniu 7 września 1995 roku przez Walne Zgromadzenie Członków Polskiego Towarzystwa Biochemicznego **Zarząd Główny** ukonstytuował się na posiedzeniu w dniu 7 grudnia 1995 roku w sposób następujący:

Prezes Prof. dr hab. **Liliana Konarska**

Wiceprezes Dod. dr hab. **Jolanta Barańska**

Sekretarz Doc. dr hab. **Małgorzata Balińska**

Skarbnik Prof. dr hab. **Zofia Porębska**

Członkowie Prezydium Zarządu: Prof. dr hab. **Stanisław Bielecki**

Prof. dr hab. **Edward Bańkowski**

Prof. dr hab. **Roman Tarnowski**

Członkowie Zarządu: prof. dr hab. **Jan Glogowski**

prof. dr hab. **Teresa Jakubowicz**

prof. dr hab. **Aleksandra Kubicz**

prof. dr hab. **Ryszard Oliński**

prof. dr hab. **Jerzy Popiginis**

prof. dr hab. **Tomasz Twardowski**

dr **Teresa Wesółowska**

Komisja Rewizyjna

Prof. dr hab. **Magdalena Fikus** — Przewodnicząca

prof. dr hab. **Anna Barańczyk-Kuźma**

prof. dr hab. **Maria Stryjecka-Zimmer**

## Konferencja pt. „New Frontiers in Cell and Molecular Biology

W dniu 2 października 1995 roku została uroczystie otwarta w Warszawie przez Dyrektora Generalnego UNESCO Prof. Federico Mayor-Zaragoza, siedziba Międzynarodowego Instytutu Biologii Molekularnej i Komórkowej UNESCO. Powstanie Instytutu zostało zagwarantowane w porozumieniu, jakie zawarł w maju tego roku Rząd Polski z UNESCO, i które we wrześniu było ratyfikowane przez Polski Parlament. Z punktu widzenia UNESCO podpisane i ratyfikowane porozumienie jest aktem wystarczającym dla uznania istnienia Instytutu, który wręcz został już wprowadzony do planów budżetu Organizacji na lata 1966/67. Ponieważ jednak obecne ustawodawstwo polskie nie przewiduje możliwości tworzenia placówek o charakterze międzynarodowym, formalne powołanie Instytutu w Warszawie będzie możliwe dopiero po uchwaleniu specjalnej ustawy sejmowej „O powołaniu Międzynarodowego Instytutu Biologii Molekularnej i Komórkowej”, będącej obecnie w przygotowaniu. Nie przeszkadza to jednak toczącym się pracom organizacyjnym oraz wykończeniowym pracom budowlanym w przyszłej siedzibie Instytutu (u zbiegu ulic Trojdena i Pawińskiego, w ramach nowobudowanego „kampusu naukowego Ochota”). W uroczystości oficjalnego otwarcia budynku przyszłego Instytutu wzięli udział przedstawiciele najwyższych władz Polskiej Akademii Nauk z Prezesem Prof. Leszkiem Kuźnickim, Komitetu Badań Naukowych z Sekretarzem KBN dr Janem Krzysztofem Frąckowiakiem, Polskiego Komitetu UNESCO z jego Sekretarzem Generalnym dr Wojciechem Fałkowskim, Światowej Sieci Biologii Molekularnej i Komórkowej UNESCO z jej Przewodniczącym Prof. Angelo Azzi oraz licznie zgromadzeni przedstawiciele naukowych środowisk z Polski i zagranicy.

Z okazji otwarcia siedziby nowego Instytutu odbyła się w dniach 2-7 października zorganizowana pod auspicjami Dyrektora Generalnego UNESCO konferencja naukowa pt. „New Frontiers in Cell and Molecular Biology” („Nowe granice biologii komórkowej i molekularnej”), w której udział wzięli przedstawiciele różnych dziedzin nauk biologicznych z zagranicy (USA, Włoch, Izraela, Wielkiej Brytanii, Szwajcarii, Kanady, Francji, Niemiec, Austrii, Węgier, Belgii, Szwecji) i z Polski. Tematyka sesji obejmowała szeroko pojęte zagadnienia z zakresu regulacji cyklu komórkowego, uaktywnienia genów, molekularnych mechanizmów przekazywania sygnałów biologicznych, programowanej śmierci komórek (apoptoza), molekularnych podstaw ruchu i adhezji komórkowej, mechanizmów transportu przez błony komórkowe, bioenergetyki i wybranych aspektów bioinżynierii molekularnej i komórkowej. Większość sesji poprzedzona była wykładami plenarnymi związanymi z tematyką sesji. Jeden wieczór został poświęcony dyskusji nad posterami

prezentowanymi przez młodych uczestników konferencji. Autorzy najciekawszych plakatów, wybranych przez kiluosobową komisję profesorską, zostali zaproszeni do ustnej prezentacji swoich wyników, ocenianej w drodze tajnego głosowania przez wszystkich obecnych w czasie sesji uczonych. Spośród trzynastu uczestników tego konkursu trzy najlepsze głosy (uzyskujące największą liczbę głosów) otrzymały specjalne nagrody Dyrektora Światowej Sieci Biologii Molekularnej i Komórkowej UNESCO. Nagrody, w wysokości 300 dolarów każda, wręczył uroczystie Prof. Angelo AZZI: mgr Grażynie Mosieniak z Warszawy za zajęcie I miejsca, mgr Joannie Cichy z Krakowa za II miejsce i mgr Arkadiuszowi Szklarczykowi z Warszawy za III miejsce.

Konferencja była wielkim sukcesem naukowym, co dobrze rokuje dla przyszłości tworzonego Międzynarodowego Instytutu Biologii Molekularnej i Komórkowej UNESCO w Warszawie.

*Maciej J. Nałęcz*

## Konferencja pt. „Progress in tumour i Biology”

W roku 1995 (31 sierpnia) profesor Mieczysław Chorąży obchodził swoje 70 urodziny. Urodził się w Janówce koło Białej Podlaskiej. W czasie okupacji niemieckiej był żołnierzem Armii Krajowej, walczył w Powstaniu Warszawskim. Po powrocie z obozu jenieckiego studiował medycynę na Akademii Medycznej w Warszawie. Po uzyskaniu dyplomu w roku 1951 został nakazem pracy skierowany do gliwickiego oddziału Instytutu Onkologii, z którym związał całe swoje zawodowe życie. Początkowo pracował pod kierunkiem Prof. K. Duxa, a następnie Prof. H. Godlewskiego. Stopień doktora nauk uzyskuje w roku 1958, doktora habilitowanego w roku 1961. W roku 1963 zostaje kierownikiem Zakładu Biologii Nowotworów. W roku 1970 uzyskuje tytuł profesora nadzwyczajnego, a w roku 1968 profesora zwyczajnego. Profesor Chorąży jest jednym z inicjatorów rozwoju biologii molekularnej w Polsce. Jego rozległe zainteresowania naukowe dotyczyły między innymi metabolizmu związków azotowych w komórkach nowotworowych, pobierania DNA przez komórki eukariotyczne, struktury genomu eukariotycznego, chemioterapii i mechanizmu działania cytostatyków z grupy akrydyn, ekspresji onkogenów. W ostatnich latach profesor Chorąży zainicjował badanie środowiskowych czynników kancerogennych na które narażeni są mieszkańcy Śląska oraz czynników genetycznych mających znaczenie w rozwoju raka płuc. Jest autorem i współautorem przeszło stu publikacji naukowych (prac oryginalnych, przeglądowych i rozdziałów podręczników). Profesor Chorąży jest członkiem rzeczywistym Polskiej Akademii Nauk (od roku 1981 w Prezydium PAN). Jest aktywnym członkiem wielu innych polskich i zagranicznych towarzystw naukowych.

Dla upamiętnienia jubileuszu Profesora Chorążego zorganizowana została konferencja „Progress in Tumour Biology”. Konferencja odbyła się w dniach 13 i 14 października 1995, w Instytucie Onkologii w Gliwicach. Wzięło w niej udział liczne grono przyjaciół oraz byłych i obecnych współpracowników Jubilata. Wykłady gości z zagranicznych instytucji z którymi współpracuje bądź współpracował profesor Chorąży złożyły się na program sesji naukowych. Swoje wykłady zaprezentowali R. A. Baan (Rijswijk, Holandia), S. Eckhardt (Budapeszt, Węgry), R. Gallo (Bethesda, USA), K. Hemminki (Sztokholm, Szwecja), J. Kieler (Kopenhaga, Dania), H. Koprowski (Filadelfia, USA), M. F. Rajewsky (Essen, Niemcy), Z. Stęplewski (Filadelfia, USA), J. Svoboda (Praga, Czechy), R. Tsanev (Sofia, Bułgaria), R. Whyatt (Nowy Jork, USA), I. Zbarsky (Moskwa, Rosja). Tematyka wykładów dotyczyła mechanizmów procesu nowotworzenia, roli uszkodzeń DNA oraz onkogenów i onkowirusów, a także współczesnych (i przyszłościowych) sposobów terapii nowotworów. Część wyników prezentowanych w czasie sesji uzyskana została we współpracy ze współpracownikami Profesora. Poza swoim programem naukowym Konferencja była również wydarzeniem towarzyskim. Miejscem odnawiania starych i nawiązywania nowych znajomości, a przede wszystkim okazją do wspomnień i wzruszeń dla wszystkich.

*Piotr Widlak*

## Ogłoszenia Zarządu Głównego

Zarząd Główny Polskiego Towarzystwa Biochemicznego zwraca się do wszystkich członków Towarzystwa z gorącym apelem o płacenie składek członkowskich za rok 1996. Jednocześnie przypominamy, że członkiem Towarzystwa może zostać również student lub młody pracownik naukowy nieposiadający jeszcze dorobku publikacyjnego. Dlatego też przypominamy regulamin statusu członka-studenta.

# REGULAMIN

## statusu Członka-Studenta

1. Celem Polskiego Towarzystwa Biochemicznego jest popieranie rozwoju biochemii i jej popularyzacja oraz integracja środowiska naukowego zajmującego się biochemią.
2. Członkiem Zwyczajnym Towarzystwa może być obywatel polski lub obcy posiadający dorobek naukowy z biochemii lub dziedzin pokrewnych (przynajmniej 1 publikacja w czasopiśmie recenzowanym).
3. Członkami Polskiego Towarzystwa Biochemicznego na prawach Członka-Studenta mogą być również studenci i młodszy pracownicy naukowcy nie posiadający wystarczającego dorobku naukowego, którzy wykazują zainteresowanie biochemią i naukami pokrewnymi.
4. Kandydaci na Członka-Studenta zostają przyjęci w poczet Członków Towarzystwa przez Zarząd Główny na podstawie pisemnej deklaracji podpisanej przez dwóch członków wprowadzających.
5. Członkowie-Studenti mają prawo do:
  - uczestnictwa w Walnych Zebraniach Towarzystwa, w zjazdach naukowych, sympozjach, konferencjach itp.
  - prenumeraty wydawnictw biochemicznych poprzez Towarzystwo (ze zniżką)
  - korzystania z ulg w opłatach za uczestnictwo w zjazdach
  - ubieganie się o opinię Władz Polskiego Towarzystwa Biochemicznego w przypadku starania się o stypendia
6. Członkowie-Studenti nie posiadają czynnego ani biernego prawa wyborczego
7. Członkowie-Studenti obowiązani są:
  - przestrzegać postanowień Statutu, Regulaminów oraz Uchwał Władz Towarzystwa
  - opłacać regularnie składki członkowskie w wysokości **1/3 składki Członka Zwyczajnego**
8. Członkostwo na prawach Członka-Studenta wygasa:
  - automatycznie po 6 latach od chwili przyjęcia do Towarzystwa, lecz nie później niż w ciągu 3 lat od chwili ukończenia studiów
  - po przyjęciu do Towarzystwa na prawach Członka Zwyczajnego
  - w przypadku skreślenia z listy członków przez Zarząd Główny z powodu nie płacenia składek
  - w przypadku wykluczenia z Towarzystwa przez Zarząd Główny
  - w przypadku wystąpienia z Towarzystwa zgłoszonego na piśmie do Zarządu Głównego

Zatwierdzony 5.09.1995.

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

**Obecny adres:**

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

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

Zarząd Główny Polskiego Towarzystwa Biochemicznego uprzejmie informujemy, że w roku 1996 rozstrzygnięta zostanie pierwsza edycja konkursu o nagrodę im. prof. dr hab. Antoniego Dmochowskiego za osiągnięcia dydaktyczne w dziedzinie nauczania biochemii. Gorąco prosimy o nadsyłanie kandydatur do tej nagrody do dnia 31 maja 1996. Jednocześnie przypominamy regulamin nagrody im. prof. dr hab. Antoniego Dmochowskiego.

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

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

Aby zaprenumerować „Postępy Biochemii” w 1996 r. należy wpłacić odpowiednią kwotę na konto bankowe wydawcy (Polskiego Towarzystwa Biochemicznego) za pomocą przekazu zamieszczonego na odwrocie. Zamówione egzemplarze będziemy wysyłać pocztą na adres podany nam na przekazie. Ponieważ odcinek przekazu docierający do nas jest jednocześnie zamówieniem, prosimy o **bardzo wyraźne** napi-

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

**Prenumerata krajowa dla instytucji:  
60.00 zł**

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

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

**Pokwitowanie dla wpłacającego**

zł .....

słownie .....

wpłacający .....

imię, nazwisko, dokładny adres z kodem pocztowym

na rachunek

Polskie Towarzystwo Biochemiczne  
02-093 Warszawa, ul. Pasteura 3  
P.B.K. XIII/O W-wa, Al. Jerozolimskie  
37 00 44-1225-139-11

**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  
P.B.K. XIII/O W-wa, Al. Jerozolimskie  
37 00 44-1225-139-11

**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  
P.B.K. XIII/O W-wa, Al. Jerozolimskie  
37 00 44-1225-139-11

stempel

Pobrano opłatę

zł. ....

.....  
podpis przyjmującego

stempel

Pobrano opłatę

zł. ....

.....  
podpis przyjmującego

stempel

Pobrano opłatę

zł. ....

.....  
podpis przyjmującego

# Wskazówki dla autorów

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

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

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

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

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

## Redakcja prosi Autorów o przestrzeganie następujących wskazówek szczegółowych:

**TEKST:** Maszynopis powinien być napisany jednostronnie czcionką wielkości standartowej, z podwójną interlinią, z lewym marginesem ok. 4 cm

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

**Strona informacyjna** maszynopisu jest nienumerowana, zawiera imiona i 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.

**PIŚMIENICTWO:** Wykaz piśmiennictwa obejmuje prace w kolejności ich cytowania w tekście, zaznacza się je liczbami porządkowymi ujętymi w nawiasy kwadratowe, np. [3,7,9,—26]. Odnośniki bibliograficzne winny mieć nową uproszczoną formę. Sposób cytowania czasopism (1), monografii (2), rozdziałów z książek jednotomowych (3), rozdziałów z tomów serii opracowanej przez tych samych redaktorów (4), rozdziałów z tomów serii opracowanej 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: Florin M, Stotz EH (red) *Comprehensive Biochemistry* t 29B. Elsevier, North-Holland Amsterdam, str 1-77
5. Franks NP, Lieb WR (1981) W: Knight CG (red) *Research Monographs in Cell and Tissue Physiology*, t 7. Elsevier, North-Holland, Amsterdam, str 243-272

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

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

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

