

POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE

POSTĘPY BIOCHEMII

PL ISSN
0032-5422



Advances in Biochemistry

TOM 45, NR 4, 1999 · · · · ·

Telomeraza i rak · · · · ·	228
Integryny i rak · · · · ·	239
Antygen CD44 · · · · ·	249
Izoformy aktyny · · · · ·	261
Transport białek i RNA · · · · ·	270
Znaczenie trombomoduliny · · · · ·	285
Plazmidy eukariotyczne · · · · ·	293
Mechanizm oporności na arsen · · · · ·	304
Aflatoksyna AFB ₁ · · · · ·	313
Biosynteza poliketydów · · · · ·	320
Zjawisko indukowanej fluorescencji	332

**Kwartalnik „*Postępy Biochemii*”
wydawany z pomocą finansową
Komitetu Badań Naukowych oraz
Instytutu Biologii Doświadczalnej
im. M. Nenckiego PAN
Indeksowany w Medline i Agro Librex**

<http://rcin.org.pl>

WYDAWCA

Editor
POLSKIE TOWARZYSTWO
BIOCHEMICZNE
Polish Biochemical Society
ul. Pasteura 3
02-093 Warszawa
Poland
tel/fax 658-20-99
e-mail — ptbioch@nencki.gov.pl
Drukarnia Naukowo-Techniczna
Mińska 65
03-828 Warszawa

REDAKCJA

Editorial Board
REDAKTOR NACZELNY
Editor in chief
ZOFIA ZIELIŃSKA
tel. 831-24-03

REDAKTORZY

Editors
GRAŻYNA PALAMARCZYK
tel. 658-47-02
ANDRZEJ JERZMANOWSKI
tel. 659-70-72 w. 3234
LILIANA KONARSKA
tel. 659-85-71 w. 352
bezp. 658-20-99
wtorki 15—18
ANNA SZAKIEL
tel. 823-20-46
IWONA FIJAŁKOWSKA
tel. 659-70-72 w. 1123
ADAM SZEWCZYK
tel. 659-85-71 w. 269
HANNA LASKOWSKA
pn. i czw. 14—16
tel. 659-85-71 w. 441

RECENZENCI ZESZYTU

Referees of this issue
LUCYNA GRĘBECKA (Warszawa)
BARBARA GRZELAKOWSKA-
SZTABERT (Warszawa)
STANISŁAW ŁOPACIUK
(Warszawa)
JANUSZ SIEDLECKI (Warszawa)
ALEKSANDRA SKŁODOWSKA
(Warszawa)
HANNA STRZELECKA-
GOŁASZEWSKA (Warszawa)
TOMASZ TWARDOWSKI (Poznań)
TERESA ŻOŁĄDEK (Warszawa)
MARIA WIECHETEK (Warszawa)
JACEK WITKOWSKI (Gdańsk)
MIROŚLAWA WŁODARSKA
(Warszawa)

ADRES REDAKCJI

Address
REDAKCJA KWARTALNIKA
„POSTĘPY BIOCHEMII”
POLSKIE TOWARZYSTWO
BIOCHEMICZNE
ul. Pasteura 3
02-093 Warszawa

SPIS TREŚCI CONTENTS

Telomeraza i rak Telomerase and cancer JANUSZ BŁASIAK	228
Integriny i ich znaczenie w progresji nowotworów złośliwych Integrins and their role in cancer progression JANUSZ BŁASIAK, JOLANTA NIEWIAROWSKA, MARCIN CIEŚLAK, CZESŁAW S. CIERNIEWSKI	239
Antygen CD44: czy występowanie jego izoform może mieć znaczenie w diagnostyce nowotworów jelita grubego? Antigen CD44: does the presence of its isoforms have significance in colorectal cancer diagnostics? PIÓTR SZYMCZYK, ZOFIA M. KILIAŃSKA	249
Izoformy aktyny — różnicowanie funkcji, zmiany w stanach patologicznych Actin isoforms — functional differentiation, the changes in the cell pathology DOROTA NOWAK, MARIA MALICKA-BŁASZKIEWICZ	261
Transport białek i RNA pomiędzy jądrem komórkowym i cytoplazmą Transport of proteins and RNAs between the nucleus and the cytoplasm MACIEJ KMIECIAK, ZOFIA SZWEJKOWSKA-KULIŃSKA, ARTUR JARMOŁOWSKI	270
Znaczenie trombomoduliny w regulacji krzepnięcia i fibrynolizy Signification of thrombomodulin in the regulation of coagulation and fibrinolysis MAGDALENA BONCLER, CEZARY WATAŁA	285
Plazmidy eukariotyczne The eukariotic plasmides KRZYSZTOF LESNIEWICZ	293
Mechanizm oporności na związki arsenu u prokariotów i eukariotów Mechanism of arsenic compounds resistance in prokaryotes and eukaryotes ROBERT WYSOCKI, PIÓTR BOBROWICZ, STANISŁAW UŁASZEWSKI	304
Mutagenność i kancerogenność aflatoksyny AFB₁ Mutagenicity and carcinogenicity of aflatoxin AFB ₁ JOANNA PIERZYNOWSKA, ELŻBIETA GRZESIUŁ	313
Kombinatoryczna biosynteza nowych makrolidów i innych poliketydów złożonych Combinatorial biosynthesis of novel macrolides and other complex polyketides KATARZYNA KUĆZEK, MAGDALENA KOTOWSKA, KRZYSZTOF PAWLIK	320
Zjawisko indukowanej fluorescencji chlorofilu jako źródło informacji o procesach fotosyntezy zachodzącej w roślinach i stanie środowiska Induced chlorophyll fluorescence as a source of information on photosynthesis in plants and environment conditions ANDRZEJ JANKOWSKI	332

Telomeraza i rak

Telomerase and cancer

JANUSZ BŁASIAK

Spis treści:

- I. Telomery i problem replikacji zakończeń chromosomów
 - I-1. Struktura telomerów
 - I-2. Problem replikacji końców liniowych chromosomów
- II. Telomeraza – struktura i funkcje
 - II-1. Podjednostka RNA
 - II-2. Podjednostka katalityczna
- III. Telomerowa hipoteza starzenia się komórek i ich nieśmiertelności
- IV. Alternatywny mechanizm wydłużania telomerów
- V. Rola telomerazy w transformacji nowotworowej
- VI. Telomeraza jako marker nowotworów
 - VI-1. Znaczenie diagnostyczne
 - VI-2. Znaczenie prognostyczne
- VII. Telomeraza w terapii przeciwnowotworowej
 - VII-1. Inhibitory odwrotnej transkryptazy
 - VII-2. Związki stabilizujące czteroniciową strukturę telomerów
 - VII-3. Oligonukleotydy antysensowne, rybozomy, peptydowe analogi kwasów nukleinowych i inne związki
- VIII. Uwagi końcowe

Wykaz stosowanych skrótów: ALT — alternatywny mechanizm wydłużania telomerów; G4-DNA — czteroniciowe struktury guaninowe; hTERT — podjednostka katalityczna telomerazy; hTEPI — białko stowarzyszone z telomerazą człowieka; hTR — podjednostka RNA telomerazy; myszy *mTR^{-/-}* — myszy z wyłączonym genem kodującym podjednostkę RNA telomerazy; PNA — peptydowe analogi kwasów nukleinowych; RT — odwrotna transkryptaza; THA1 — telomerowa hipoteza starzenia się komórek i ich nieśmiertelności; TRF1 i TRF2 — białka wchodzące w skład telomerów.

*Dr hab., Katedra Genetyki Molekularnej Uniwersytetu Łódzkiego, ul. Banacha 12/16, 90-237 Łódź, e-mail: januszb@biol.uni.lodz.pl

Contents:

- I. Telomeres and chromosome ends replication problem
 - I-1. Structure of telomeres
 - I-2. Linear chromosome ends replication problem
- II. Telomerase – structure and functions
 - II-1. RNA subunit
 - II-2. Catalytic subunit
- III. Telomere hypothesis of cell aging and immortalization
- IV. Alternative lengthening of telomeres
- V. Role of telomerase in neoplastic transformation
- VI. Telomerase as a marker of cancers
 - VI-1. Diagnostic potential
 - VI-2. Prognostic potential
- VII. Telomerase as a target for anti-cancer therapy
 - VII-1. Reverse transcriptase inhibitors
 - VII-2. Compounds that mimic G-quadruplex structure in telomeres
 - VII-3. Antisense oligonucleotides, ribozymes, peptide nucleic acids and other compounds
- VIII. Concluding remarks

I. Telomery i problem replikacji zakończeń chromosomów

I-1. Struktura telomerów

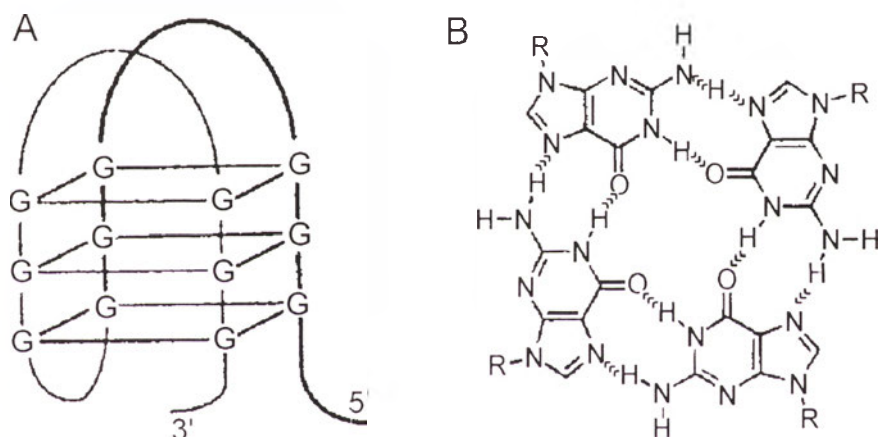
Telomery, stanowiące zakończenia chromosomów eukariontów, są kompleksami nukleoprotein zbudowanymi z krótkich tandemowych powtórzeń DNA i związanych z nimi białek. Taka struktura odróżnia telomery od zakończeń chromosomów powstałych wskutek ich pęknięcia. Sekwencje tandemowo powtózonego telomerowego DNA w ewolucyjnie odległych eukariontach wykazują wysoki stopień homologii [1]. Wzór powtórzeń zawiera zazwyczaj bogatą w guaniny sekwencję liczącą 8-26 pz. Większość telomerowego DNA ma strukturę dwuniciową, jednakże ich zakończenia 3' zawierają jedno-

niciowe odcinki liczące 12-16 nukleotydów [2]. Podstawowy wzór powtórzeń telomerowego DNA człowieka ma postać 5'-TTAGGG-3', a ich liczba jest większa w komórkach rozrodczych niż w komórkach somatycznych, w których wynosi 1000-3000 [3]. W prawidłowych diploidalnych komórkach człowieka znajdujących się w fazie G₀ zakończenia telomerów zawierają jednoniciowe odcinki składające się z 45-200 guanin [4].

Głównymi poznanymi dotąd białkami wchodzącymi w skład telomerów są TRF1 i TRF2 [1, 5]. TRF1 bierze udział w tworzeniu telomerowej struktury drugorzędowej, mającej znaczenie dla regulacji długości telomerów. Pęknięte chromosomy mogą wywoływać apoptozę komórki, jednak ich naturalne zakończenia — telomery — nie wywołują reakcji apoptotycznej dzięki mechanizmowi, w którym bierze udział TRF2 [6]. Z TRF1 stowarzyszona jest tan-

I-2. Problem replikacji końców liniowych chromosomów

Replikacja liniowego DNA z jednoniciowymi zakończeniami 3' nie może być kompletna jeżeli jest prowadzona przez polimerazę DNA wymagającą startera i matrycy. Gdy do zakończenia jednoniciowego 3' zostanie przyłączony starter RNA dla syntezy fragmentu Okazaki, to po replikacji i usunięciu startera jednoniciowe zakończenie 3' nici opóźnionej zostanie odtworzone i nie nastąpi utrata dwuniciowych fragmentów DNA (Ryc. 3). Jednakże na końcu nici prowadzącej powstanie zakończenie dwuniciowe, którego długość odpowiada długości zakończenia cząsteczki rodzicielskiej, ale bez jednoniciowego zakończenia 3'. W następnej rundzie replikacji powstanie niewypełniony obszar od strony 5', prowadzący do utraty DNA. W komórkach ssaków



Ryc. 1. Czteroniciowa struktura DNA przyjmowana przez jednoniciowe zakończenia telomerów. Pojedyncza bogata w guaniny nić DNA może przyjmować konformację czteroniciową (A), poprzez tworzenie kwartetów guaninowych (B).

kyraza, białko mające właściwości polimerazy DNA [7]. Geny znajdujące się w sąsiedztwie telomerów są często upakowane w trudno dostępne struktury, co jest przyczyną epigenetycznego hamowania ich transkrypcji, określanego jako efekt wyciszania telomerowego lub telomerowego efektu pozycyjnego [8].

Znajdujące się w zakończeniach telomerów jednoniciowe odcinki bogate w reszty guaninowe mogą przybierać konformację czteroniciowych prawoskrętnych helis (G4-DNA) (Ryc. 1A), zbudowanych z powtarzających się czterech reszt guaninowych leżących w jednej płaszczyźnie (kwartetów guaninowych) [9]. Każda z guanin jest zarówno donorem jak i akceptorem wiązań wodorowych Hoogsteena (Ryc. 1B). Przypuszcza się, że kwartety mogą brać udział w łączeniu się siostrzanych chromatyd w mitozie i tworzeniu par homologicznych chromosomów w mejozie, lecz nie zostało to jeszcze potwierdzone doświadczalnie [10].

utrata telomerowego DNA zachodzi przypuszczalnie także na skutek aktywności 5'→3' egzonukleazy [4].

Problem replikacji końców liniowych chromosomów może być rozwiązywany przez mechanizm z udziałem telomerazy, odwrotnej transkryptazy, która jest niezależna od matrycy DNA w nici rodzicielskiej. Zamiast tego podjednostka odwrotnej transkryptazy telomerazy używa fragmentu zawartego w niej RNA jako matrycę dla syntezy powtórzeń telomerowych (Ryc. 2).

II. Telomeraza – struktura i funkcje

U człowieka aktywna telomeraza jest zbudowana z co najmniej trzech podjednostek: podjednostki RNA, hTR, stanowiącej matrycę dla odwrotnej transkryptazy, podjednostki katalitycznej, hTERT, oraz białka stowarzyszonego z telomerazą hTEP1 (Ryc. 2).

Szczegółowa trójwymiarowa struktura telomerazy nie została jeszcze określona, lecz wyniki dotychczas przeprowadzonych badań wskazują, że podczas wydłużania telomerów pomiędzy starterem DNA i matrycą RNA w rdzeniu kompleksu telomerazy tworzą się wiązania typu Watsona-Cricka [11-13].

II-1. Podjednostka RNA

Podjednostka RNA telomerazy człowieka, hTR, zawiera obszar matrycowy obejmujący 11 nukleotydów o sekwencji 5'-CUAACCCUAAC-3' komplementarny do powtórzeń telomerowych (TTAGGG)_n [14]. Gen kodujący hTR znajduje się w dłuższym ramieniu chromosomu 3. W obszarze podlegającym transkrypcji genu *hTR* znajdują się długie odcinki następujących po sobie reszt tymidylowych, co razem z wrażliwością na α -amanitynę pozwala przypuszczać, że hTR może być transkryptem polimerazy RNA II. Na końcu 3' transkryptu hTR brak jest odcinka poliadenylowego. Właściwości te mogą być konsekwencją regulacji ekspresji genu *hTR* przez kompleks transkrypcyjny charakterystyczny dla promotorów genów małego jądrowego RNA [15].

kodującym obszar matrycowy hTR wywołują zaburzenia funkcjonowania telomerazy – zmiana sekwencji z CUAACCCUA na CAAACCCAA, powoduje syntezę sekwencji (GGGTT)_n, zamiast (GGA-TTT)_n [14].

II-2. Podjednostka katalityczna

Białko hTERT, które u człowieka zostało niezależnie odkryte przez kilka zespołów i oznaczane czasem jako hTRT [19], hEST2 [20] bądź hTCS1 [21], jest przypuszczalnie podjednostką katalityczną telomerazy. U orzęsków odkryto także inne białka związane z telomerazą – p80 [22], którego homolog, hTLP1 lub TEP1, wykryto u człowieka [23], oraz p59, jednakże hTR i hTERT wystarczają dla osiągnięcia aktywności telomerazy *in vitro* [24-26].

Cztery domeny białka hTERT: N-końcowa, zaszadowa, domena odwrotnej transkryptazy (RT) i C-końcowa wykazują homologie z odpowiednimi domenami podjednostek katalitycznych telomerazy orzęska *Euplopes aediculatus* i drożdży *Saccharomyces cerevisiae*, z najwyższym stopniem podobieństwa w domenie RT [21].



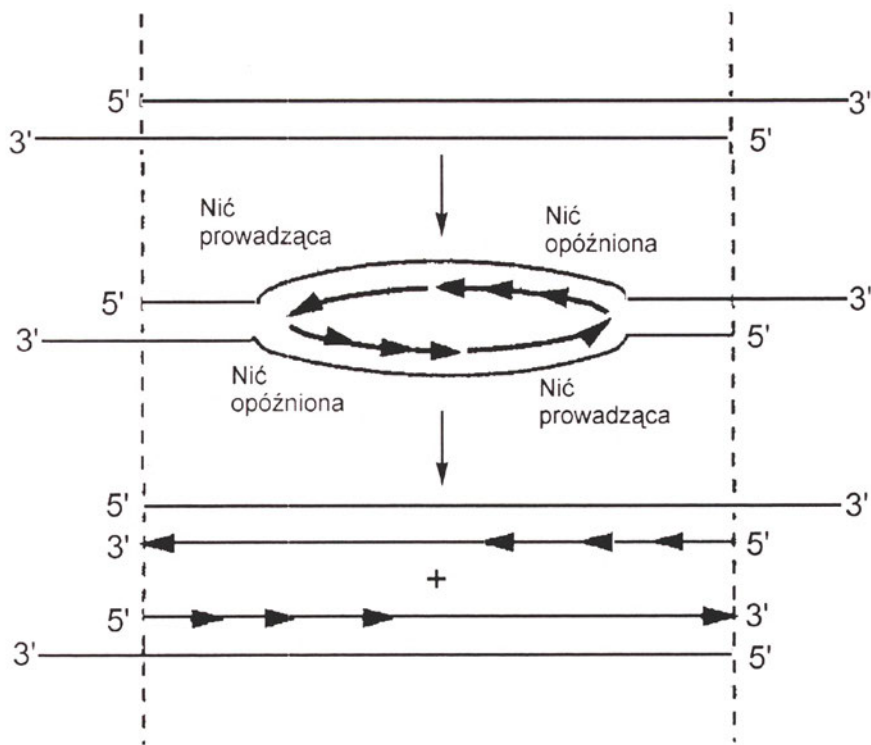
Ryc. 2. Telomery i telomeraza. Z telomerami łączą się dwa białka TRF1 i TRF2. Telomeraza, składająca się z podjednostki katalitycznej, hTERT, i podjednostki RNA, dokonuje syntezy powtórzeń telomerowych przy zastosowaniu sekwencji rdzeniowej RNA jako matrycy.

Długość dojrzałego transkryptu hTR wynosi około 450 nukleotydów. Natomiast u orzęsków wynosi 153-192 nukleotydów [12], a u *Saccharomyces cerevisiae* 1300 nukleotydów [13], przy bardzo niskim stopniu homologii sekwencyjnej. Pomimo braku homologii w długości i strukturze pierwszorzędowej RNA telomerazy różnych gatunków, istnieją przesłanki pozwalające na doszukiwanie się podobieństw w strukturze drugorzędowej [16]. W hTR można rozważać istnienie dwóch domen funkcjonalnych: domenę 3' biorącą udział w wiązaniu substratu oraz domenę 5' pełniącą rolę matrycy w procesie wydłużania telomerów.

Gen kodujący hTR znajduje się w dłuższym ramieniu chromosomu 3, w obszarze 3q21-q28 [17], a jego obszar promotorowy leży 231 pz w górę od miejsca startu transkrypcji [18]. Mutacje w rejonie

Gen kodujący hTERT znajduje się w krótszym ramieniu chromosomu 5, w obszarze 5p15.33 [20] i zawiera 16 eksonów i 15 intronów obejmujących obszar około 35 kpz. Promotor *hTERT* jest bogaty w parę GC, natomiast nie wykryto w nim kaset TATA i CAAT [27-28]. Miejsce inicjacji transkrypcji jest odległe o 19 pz od pierwszego nukleotydu sekwencji cDNA *hTERT*. W promotorze można wyróżnić sekwencję rdzeniową (181 pz) zawierającą kasetę E (CACGTG), będącą potencjalnym miejscem wiązania czynników c-Myc i Sp1. c-Myc może powodować bezpośrednią aktywację transkrypcji *hTERT* [29]. Właściwości te wskazują na ścisłą kontrolę transkrypcyjną ekspresji genu *hTERT*.

Sekwencjonowanie klonów z biblioteki cDNA pozwoliło na zidentyfikowanie szeregu wariantów sekwencji transkryptu hTERT [21]. Obszar najwięk-



Ryc. 3. Problem replikacji końców. Telomery zawierają jednoniciowe zakończenia 3' dla których brak jest matrycy w macierzystej cząsteczce DNA podczas replikacji, wobec czego brak będzie takich zakończeń w niciach prowadzących potomnych cząsteczek DNA.

szej zmienności obejmuje domenę odwrotnej transkryptazy i w mniejszym stopniu obszar *C*-końcowy, natomiast nie wykryto wariantów w obszarze *N*-końcowym i domenie zasadowej. Istnienie wariantów transkryptów hTERT wskazuje na możliwość alternatywnego składania jego mRNA (Ryc. 4). Funkcja alternatywnych transkryptów nie została jeszcze poznana, jednak pozycja miejsc składania wskazuje, że wiele z nich nie koduje funkcjonalnej odwrotnej transkryptazy. W końcowym odcinku 5' mRNA hTERT znajduje się szereg kodonów CUG zgodnych z sekwencją najwyższej zgodności Kozaka; w obszarze tym może leżeć miejsce inicjacji translacji [21].

III. Telomerowa hipoteza starzenia się komórek i ich nieśmiertelności

W każdym podziale komórkowym następuje utrata telomerowego DNA, której może towarzyszyć lub nie jego kompensacja. Proces ten jest nazywany dynamiką telomerów. W komórkach somatycznych człowieka dynamika telomerów ma charakter ujemny — w ciągu cyklu komórkowego więcej telomerowego DNA ubywa niż ulega syntezie [30]. Utrata telomerowego DNA w ludzkich fibroblastach wynosi 77 pz/telomer/cykl komórkowy. Ujemna dynamika może stanowić wyznacznik zdolności proliferacyjnej ludzkich komórek somatycznych. Po około 50 podziałach, komórki wkraczają w fazę, w której stają

się niezdolne do dalszych podziałów; stan ten jest umownie nazywany fazą kryzysu [30, 31]. Model ten jest znany jako telomerowa hipoteza starzenia się komórek i ich nieśmiertelności (THAI)¹. Podstawowymi spostrzeżeniami leżącymi u podstaw THAI są skracanie się telomerów wraz z wiekiem ludzkich komórek somatycznych oraz aktywacja telomerazy w większości ludzkich komórek rakowych. Pojawienie się telomerazy zdolnej do wypełniania swej funkcji katalitycznej może być zatem rozważane jako krok w drodze komórek do nieśmiertelności i ich zdolności do nowotworzenia [32]. Jednakże w ostatnich latach pojawiło się szereg wątpliwości dotyczących THAI. Wyniki badań na myszach mających wyłączony gen kodujący podjednostkę RNA telomerazy (myszy *mTR*^{-/-}) wykazały, że u zwierząt tych może dochodzić do rozwoju nowotworów, pomimo braku aktywności telomerazy [33]. Efekt ten tłumaczono poprzez nieadekwatność myszy jako modelu procesów starzenia i nowotworzenia u ludzi oraz poprzez istnienie niezależnego od telomerazy mechanizmu wydłużania telomerów u myszy *mTR*^{-/-}. Jednakże należy brać także pod uwagę, że u myszy *mTR*^{-/-}, w porównaniu z ich rówieśnikami z prawidłowo funkcjonującym genem *hTR*, następowało znaczne przyspieszenie procesów starzenia wiążące się z osłabieniem układu odpornościowego, mogącym prowadzić do rozwoju nowotworów. Wprowadzenie genu kodującego podjednostkę katali-

¹Problem telomerowej hipotezy starzenia się komórek został poruszony w artykule w nr 3 *Postępów Biochemii* z 1994 roku.

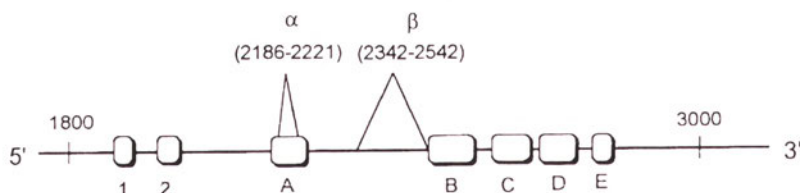
lityczną telomerazy, *hTERT*, do ludzkich komórek, które nie wykazywały zdolności do podziału i były pozbawione telomerazy, powodowało wydłużenie telomerów i przedłużenia okresu ich życia bez zmian kariotypowych charakterystycznych dla unieśmiertelnionych komórek nowotworowych [34]. Należy zatem przyjąć, że THAI wyznacza jedynie ogólny obraz regulacji długości telomerów w komórkach człowieka, jednak w niektórych liniach komórek unieśmiertelnionych i komórkach rakowych możliwa jest regulacja długości telomerów poprzez mechanizmy niezależne od telomerazy [35, 36].

W jednym z najbardziej spektakularnych doświadczeń ostatnich lat wiążących telomerazę z procesami starzenia wykazano, że wprowadzenie genu kodującego białkowy składnik telomerazy do prawidłowych ludzkich komórek *in vitro* — fibroblastów i komórek nabłonka siatkówki po osiągnięciu przez nie limitu Hayflicka — powoduje wydłużenie ich telomerów do długości typowej dla młodych komórek i że komórki te okazują także inne cechy charakterystyczne dla młodych komórek — następuje ich „odmłodzenie” [34, 37, 38]. Wyniki tych doświadczeń nie tylko sugerują, że telomeraza może być istotnym elementem procesu starzenia się komórek, lecz także wskazują, że proces ten może zostać przesunięty do wcześniejszego punktu, powodując wydłużenie okresu życia komórek nie związane z

racje te nie dotyczą punktu kontrolnego G₁ zależnego od białka p53, co stwierdzono przez funkcjonalną inaktywację białka p53 w reakcji na promieniowanie i indukcję p21(Waf1/Cip1/Sdi1) [41].

IV. Alternatywny mechanizm wydłużania telomerów

Telomeraza może mieć kluczowe znaczenie dla wyjścia komórek z fazy poruszanego w poprzednim podrozdziale kryzysu, gdyż transfekcja komórek genem *hTERT* powoduje ich przejście przez kryzys [42]. Jednak wydłużanie telomerów może zachodzić w liniach komórkowych nie wykazujących aktywności telomerazy, po przejściu kryzysu i unieśmiertelnieniu *in vitro* [43]. Można zatem rozważać alternatywny mechanizm wydłużania telomerów (ALT), którego działanie jest niezależne od telomerazy [35, 43]. U drożdży pozbawionych genu podjednostki katalitycznej obserwuje się śmierć większości komórek, jednak część z nich zachowuje zdolność do dalszego rozwoju poprzez cyrkularyzację chromosomów albo utrzymanie telomerów poprzez rekombinację [44]. Pomimo, że nie można zakładać, że we wszystkich unieśmiertelnionych komórkach wykazujących brak aktywności telomerazy ma miejsce jednakowy ALT, to jednak jest bardzo prawdopodobne, że ALT u człowieka obejmuje rekombinację i re-



Ryc. 4. Schemat mRNA podjednostki katalitycznej telomerazy, hTERT. Przedstawiono odcinek pomiędzy zasadami 1500 i 3000. 1 i 2 są obszarami specyficznymi dla telomerazy, natomiast domeny A-D występują w odwrotnych transkryptazach. α i β oznaczają miejsca alternatywnego składania. Składanie w miejscu α daje 36 zasadową delecję w obszarze występującym w odwrotnych transkryptazach A, składanie w miejscu β daje 182 zasadową delecję powodującą mutację nonsensowną przynoszącą zakończenie białka przed obszarem B charakterystycznym dla odwrotnych transkryptaz.

ich transformacją nowotworową [39, 40]. Możliwe konsekwencje tych badań pobudzają wyobraźnię, ale radykalne sformułowanie wniosków i określenia możliwości wpływania na cykl życiowy organizmów przez manipulowanie telomerazą wymaga dalszych badań. Wiadomo, że wydłużenie okresu zdolności replikacyjnej komórek może nastąpić na skutek inaktywacji białka p53 związanej z utratą stabilności genomowej. Wydłużenie okresu życia fibroblastów wymuszone przez telomerazę powoduje zaburzenia stabilności genomu ujawniające się w postaci przejściowych aberracji chromosomalnych, jednakże aber-

trotranspozycję [45, 46]. ALT ma miejsce także w komórkach linii raków oraz komórkach pochodzących z guzów złośliwych [36]. Wszystkie zbadane do tej pory komórki unieśmiertelnionych linii oraz komórki rakowe wykazują albo aktywność telomerazy albo ALT [36]. Hybrydy komórek unieśmiertelnionych z komórkami tracącymi po pewnym czasie zdolność do podziałów, zachowują się tak jak te drugie, co wskazuje, że fenotyp prawidłowych komórek z zanikiem zdolności do podziałów dominuje nad fenotypem komórek unieśmiertelnionych i że w tych ostatnich mogła nastąpić utrata, mutacja lub in-

aktywacja genu lub genów związanych z unieśmiertelnieniem [47]. Hipotezę tę potwierdza przywrócenie śmiertelności unieśmiertelnionym komórkom przez wprowadzenie do nich prawidłowych chromosomów człowieka [48]. Geny związane z zanikiem zdolności do podziałów komórkowych zostały przypisane do 10 różnych *loci* [49]. Sugeruje się, że w unieśmiertelnionych komórkach wykazujących brak aktywności telomerazy istnieje gen lub geny, które działają jako represory telomerazy i biorą udział w utrzymaniu długości telomerów [50].

Zaobserwowano, że linie unieśmiertelnionych komórek wykazujących brak telomerazy zawierały, zarówno w jądrze jak i cytoplazmie, nie związane z chromosomami DNA hybrydyzujący z powtórzeniami telomerowymi TTAGGG [51]. Zatem można rozważać mechanizm pozwalający na utrzymanie długości telomerów, w którym następuje uwalnianie fragmentów telomerowych. Pojawianie się telomerowego DNA było związane z utratą funkcji białka p53 w badanych komórkach.

Lepsze zrozumienie i sformułowanie THAI może pomóc w znalezieniu narzędzi do regulacji długości telomerów w komórkach człowieka. Dla osiągnięcia tego celu znaczenie może mieć chromosomowa specyficzność długości telomerów – krótsze ramię chromosomu 17 ma krótki telomer i zaproponowano, że właśnie jego długość, a nie średnia długość charakterystyczna dla kariotypu, może determinować wskazania „zegara mitotycznego” [52]. Główny gen supresorowy transformacji nowotworowej, *p53*, znajduje się właśnie w 17p, co stwarza możliwość hamowania nowotworzenia przez telomer 17p.

V. Rola telomerazy w transformacji nowotworowej

Aktywność telomerazy stwierdza się w większości pierwotnych raków i liniach komórek rakowych człowieka. W raku sutka i płuc aktywność telomerazy może być wykrywana w bardzo wczesnym stadium – nawet w zmianach przedrakowych obserwowanych u aktualnych i byłych palaczy tytoniu [53].

Gen *p53* i kodowane przez niego białko ulegają zmianom w wielu nowotworach złośliwych. Inaktywacja *p53* i innego genu supresorowego, *pRB*, powoduje wydłużenie życia komórek, lecz zazwyczaj nie prowadzi do ich unieśmiertelnienia [54]. W przedłużonym okresie następuje dalsze skracanie telomerów aż do osiągnięcia fazy kryzysu. Nieliczne komórki, które przetrwały kryzys są unieśmiertelnione. Końcowemu różnicowaniu komórek somatycznych oraz zakończeniu cyklu komórkowego towarzyszy

zmniejszenie aktywności telomerazy [55]. Związek taki wykazano dla szlaku związanego z białkiem pRB w raku sutka [56]. Badając preparaty pochodzące ze złośliwych guzów sutka stwierdzono również, że guzy z podwyższonym poziomem aktywności telomerazy wykazywały akumulację białka p53, co może być związane z wyższym tempem proliferacji komórek takich guzów [57]. Pewne zaskoczenie może stanowić fakt, że obecność mutacji w genie *p53* nie była związana z poziomem aktywności telomerazy, jednakże dla ostatecznego sformułowania braku tego związku niezbędne są dalsze badania. Wyniki dotychczasowych doświadczeń wskazują, że aktywacja telomerazy w raku jest poprzedzona inaktywacją genów supresorowych, przy czym zasadnicze znaczenie ma tutaj *p53*, natomiast rola *pRB* jest mniejsza [58]. Jednakże cytowane wcześniej rezultaty zdają się sugerować coś innego. W raku sutka, tak jak i w innych nowotworach złośliwych, zaburzenia cyklu komórkowego są powszechne i prawdopodobnie niezbędne dla ich progresji. Zmiany procesów związanych z p53 i pRB można powiązać z aktywnością telomerazy [56], wobec czego należy brać pod uwagę także szlak aktywacji telomerazy nie związanej z długością telomerów, lecz z zaburzeniem ekspresji genów supresorowych lub/i ich produktów.

Białko Bcl-2, mające znaczenie w regulacji apoptozy, może modulować aktywność telomerazy [59]. Wprowadzenie do komórek rakowych oligonukleotydu TTAGGG powodujące hamowanie aktywności telomerazy wywoływało zwiększenie tempa apoptozy indukowanej przez szereg związków [60]. Telomeraza może hamować kaskadę sygnałów apoptotycznych i prowadzić w ten sposób do unieśmiertelnienia komórek i promocji nowotworów.

Jak wspomniano w regulacji ekspresji genu *hTERT* może brać udział czynnik transkrypcyjny c-Myc, kodowany przez protoonkogen *MYC*. W istocie przyłączenie c-Myc do genu *hTERT* powoduje transformację nowotworową fibroblastów i co więcej, nie może on być w tym procesie zastąpiony przez żaden z innych znanych czynników [61]. Zasadniczym krokiem w powstawaniu funkcjonalnego kompleksu telomerazy i utrzymaniu jego aktywności w raku sutka może być fosforylacja hTERT i hTEP1 przez kinazę białkową C [62].

W prawidłowych komórkach somatycznych telomeraza może podlegać supresji, natomiast w komórkach nowotworowych ulegać aktywacji. Aktywacja telomerazy powoduje nabywanie fenotypu złośliwego — telomeraza komórek raka sutka jest efektywnie hamowana przez gen lub geny znajdujące się w 3p12-p22 [63].

VI. Telomeraza jako marker nowotworów

VI-1. Znaczenie diagnostyczne

Wyniki szeregu badań wskazują na telomerazę jako najbardziej specyficzny marker chorób nowotworowych znany do tej pory — w jednym z nich aktywność telomerazy stwierdzono w 758 z 895 (85%) guzów złośliwych, lecz nie stwierdzono w żadnej z 70 próbek prawidłowych tkanek somatycznych [64]. Wszystkie badane dotąd linie komórek rozrodczych wykazują aktywność telomerazy, a słaba aktywność może być wykrywana w limfocytach krwi obwodowej (Tabela 1). Po stymulacji prawidłowych limfocytów T mitogenem aktywność telomerazy wzrasta 10-1000-krotnie [65]. Aktywność taka może być przyczyną zawyżonego wyniku pomiaru aktywności telomerazy w guzach, w których występuje duża ilość infiltrujących limfocytów [66]. Obecność ta-

przypisania im charakteru łagodnego przy użyciu tradycyjnie stosowanych metod. Telomeraza może zatem być markerem bardzo wczesnych zmian nowotworowych. W niektórych przypadkach aktywność telomerazy stwierdzono w materiale znacznie łatwiej dostępnym niż próbki guza, np. w płynie pochodzącym z przemycia pęcherza moczowego przy raku tego narządu, płwocinie przy raku płuc, głowy i szyi, czy krwi przy przerzutach raka sutka i gruczołu krokowego [68]. Aktywność telomerazy wykrywana w tych płynach pochodziła z pewnością z komórek nowotworowych złuszczonej z guza, jej obecność może więc pośrednio świadczyć o aktywności nowotworu.

VI-2. Znaczenie prognostyczne

Wysoka aktywność telomerazy w guzach żołądka [68], jelita grubego [69] i nerwiaku [70] jest wy-

Tabela 1.

Aktywność telomerazy w komórkach nowotworowych i prawidłowych^a

Rodzaj nowotworu ^a	Zmiany o charakterze łagodnym i stany przedrakowe ^b	Komórki prawidłowe ^b
Rak sutka (117/125)	Polipy jelita grubego (0/20)	Komórki rozrodcze (4/4)
Rak żołądka (72/85)	Gruczolaki jelita grubego (0/1)	Tkanki somatyczne (0/70)
Rak jelita grubego (53/56)	Gruczolaki żołądka (1/2)	Limfocyty krwi obwodowej (0-55/124) ^c
Nerwiak niedojrzały (99/105)	Zapalenie wątroby (19/38)	
Rak mózgu (42/59)	Włókniakogruczołak piersi (2/3)	
Rak jajników (7/7)	Metaplasja jelitowa (1/13)	
Rak płuc (120/147)	Różne nieprawidłowości sutka (0/6)	
Rak dróg moczowych (18/20)	Marskość wątroby (6/8)	
Raki krwi (78/111)	Nerwiak zwojowy (0/4)	
Rak wątroby (28/33)	Oponiak łagodny (4/27)	
Rak nerek (40/55)	Mięśniak gładki (0/103)	

^aKompilacja danych z [64] i [67]; ^b(liczba przypadków, w których wykryto aktywność telomerazy/liczba zbadanych przypadków) ^cw zależności od liczby badanych limfocytów

kich limfocytów może być przyczyną aktywności telomerazy w niewielkiej (około 6%) ilości próbek ograniczających guz i nie charakteryzujących się występowaniem zmian histopatologicznych [67]. Zatem wykrywalna aktywność telomerazy może być wyznacznikiem zakresu radykalnego zabiegu chirurgicznego. Duże znaczenie może mieć wykrycie aktywności w 14% zmian łagodnych i stanów przedrakowych. Stwierdzenie aktywności enzymu w tych próbkach może być świadectwem błędnego

znacznikiem niekorzystnego rokowania, podczas gdy u pacjentów, u których nie wykrywa się aktywności telomerazy może następować spontaniczna regresja choroby [70]. Również w raku sutka istnieje korelacja pomiędzy szeregiem wskaźników prognostycznych i poziomem aktywności telomerazy [71]. Podjednostka RNA może być także rozważana jako marker prognostyczny nerwiaka niedojrzałego [72]. Wartość telomerazy jako markera może być szczególnie przydatna w rakach, w których istnieją ściśle

określone opcje postępowania klinicznego w zależności od agresywności choroby, na przykład może być silnym markerem prognostycznym raka sutka u pacjentek bez zajętych węzłów chłonnych, determinując zastosowanie lub odstępianie od chemoterapii adjuwantowej.

W uzupełnieniu zastosowania telomerazy do prognozowania przebiegu choroby nowotworowej może ona być także stosowana do określania efektywności terapii przeciwrakowej w oparciu o korelację pomiędzy ekspresją telomerazy i unieśmiertelnieniem komórek oraz ich stadium zróżnicowania.

VII. Telomeraza w terapii przeciwnowotworowej

Badanie inhibitorów telomerazy może stwarzać szansę na ich wykorzystanie kliniczne. Skracanie telomerów może stanowić zasadniczą część procesu starzenia się komórek i jest obserwowane zarówno *in vivo* jak i w pierwotnych kulturach komórkowych [3, 72]. Po pewnej liczbie podziałów komórkowych, komórki kultur w których nie następuje ekspresja telomerazy zostają wstrzymane w fazie G₁ i tracą zdolność do dalszych podziałów. Komórki po transfekcji niektórymi onkogenami wirusowymi są zdolne do około 20 dalszych podziałów, po których wchodzi w fazę kryzysu, kończącą się śmiercią większości z nich. Jednakże mała część komórek może przetrwać kryzys i dać początek linii komórek unieśmiertelionych, których wzrost prowadzi do rozwoju guza. Ponieważ jednak w komórkach rakowych telomery nie są znacząco dłuższe od telomerów komórek w fazie kryzysu, potrzeba hamowania aktywności telomerazy może być wymagana jedynie przez kilka podziałów. Zatem inhibitory telomerazy mogą być najbardziej przydatne w terapii adjuwantowej i leczeniu stanów przedrakowych oraz w niektórych typach białaczek, w których przejście choroby w fazę ostrą jest związane z zyskaniem aktywności telomerazy [73]. Podawanie inhibitorów w łagodnej fazie choroby może zapobiegać powstawaniu klonów komórek wpływających na agresywny przebieg choroby.

VII-1. Inhibitory odwrotnej transkryptazy

Telomeraza charakteryzuje się szeregiem niespotykanych u innych enzymów cech. Zawiera ona cząsteczkę RNA i funkcjonuje jako polimeraza DNA zależna od RNA — odwrotna transkryptaza [75]. Cechy te mogą zostać wykorzystane w projektowaniu leków, których celem będzie telomeraza. Inhibitory odwrotnej transkryptazy z ludzkiego wirusa HIV ha-

mują aktywność telomerazy i mogą stanowić prototyp tego typu leków [76, 77]. Aktywność enzymu może być hamowana przez amidowe pochodne antracenu [78]. Holoenzym telomerazy zawiera także podjednostkę regulacyjną, która może stanowić potencjalny cel w rozwoju inhibitorów [23, 79, 80]. Aktywność telomerazy w komórkach guzów sutka może być hamowana przez fosfatazę białkową 2A, co stwarza możliwość regulowania aktywności telomerazy przez fosforylację jej podjednostki białkowej [81].

VII-2. Związki stabilizujące czteroniciową strukturę telomerów

Obecność jednoniciowych bogatych w guaniny zakończeń 3' telomerów sprzyja przyjmowaniu przez nie różnorodnych konformacji czteroniciowych. Jednakże optymalną konformacją substratu telomerazy jest prostoliniowa struktura jednoniciowa z dostępnymi wszystkimi grupami funkcjonalnymi dla wiązania matrycy. Stabilizacja struktury czteroniciowej w telomerach może uniemożliwiać wiązanie telomerazy lub hamować jej aktywność; wyznacza to nowe perspektywy dla rozwoju leków przeciwnowotworowych.

Szczególne konfiguracje czteroniciowych struktur telomerowych (Ryc. 1) — z czterema rowkami niejednakowej szerokości, oddziałujących ze sobą elektrostatycznie — może być rozpoznawana przez niewielkie ligandy, które mogą się wiązać w rowkach lub interkalować w sposób podobny do interkalatorów trójniciowego DNA [82]. Zidentyfikowano szeregi związków, w tym porfiryne, antrachinony oraz pochodne perylenu, które mogą rozpoznawać czteroniciową strukturę telomerów i hamować aktywność telomerazy *in vitro* [83]. Jednakże żaden z tych związków nie jest interkalatorem struktury czteroniciowej. W obecności pochodnych piperydiny, struktura rdzenia formy czteroniciowej pozostaje niezmienną, ponieważ związki te nie interkalują lecz przylegają do płaszczyzny wyznaczonej przez skrajny kwartet guaninowy, co może prowadzić do zespolenia dwóch struktur czteroniciowych. Większość interkalatorów podwójnej helisy DNA, w tym bromek etydyny i proflawina, słabo interkaluje struktury czteroniciowe [84], natomiast specyficzne dla struktur czteroniciowych mogą być barwniki karbocyjaninowe [84]. Specyficzność jest jedną z najważniejszych cech, które powinny charakteryzować związki mające za cel stabilizację struktur czteroniciowych, gdyż substancje te muszą się z nimi wiązać pomimo zdecydowanej przewagi dwuniciowego DNA w ich

otoczeniu. Pochodne porfiryny wykazują dwukrotnie większe powinowactwo do struktur czteroniciowych niż do dwuniciowych [85] i hamują efektywnie aktywność telomerazy komórek rakowych, wstrzymując wzrost komórek w G₂-M [86]. Istnienie struktur G4-DNA nie zostało dotąd stwierdzone *in vivo*, natomiast *in vitro* mogą istnieć co najmniej trzy klasy takich struktur, zależnie od orientacji nici i konformacji guanin. Większość badań dotyczących wiązania ligandów do G4-DNA została przeprowadzona na strukturach o niciach równoległych, ale nie jest pewne, czy inhibitory telomerazy mogą wykazywać specyficzne powinowactwo do tej właśnie klasy. Należy także brać pod uwagę, że G4-DNA stanowią stabilne struktury charakteryzujące się znaczną sztywnością i rozdzielenie dwóch kwartetów guaninowych konieczne dla wbudowania interkalatora wymaga stosunkowo wysokiej energii [87]. Czy zatem sygnalizowane wcześniej wiązanie się ligandów na zewnątrz G4-DNA ilustruje ogólną zasadę i czy będzie w ogóle możliwe stworzenie dużych płaskich cząsteczek, które będą rzeczywiście interkalować G4-DNA? Odpowiedź na to i inne pytania dotyczące związków stabilizujących czteroniciową strukturę DNA na zakończeniach telomerów wymaga dalszych studiów.

VII-3. Oligonukleotydy antysensowe, rybozomy, peptydowe analogi kwasów nukleinowych i inne związki

Podjednostka RNA telomerazy, hTR, może być rozważana jako miejsce w terapii genowej ze względu na swoją dostępność dla kwasów nukleinowych oraz zasadniczą funkcję matrycy przy syntezie powtórzeń telomerowych (TTAGGG)_n. Koncepcyjnie najprostsze wydaje się hamowanie aktywności telomerazy przez zablokowanie jej podjednostki RNA w miejscu matrycy oligonukleotydem do niej komplementarnym, czyli o sekwencji odpowiadającej wzorowi powtórzenia telomerowego. W istocie efekt hamowania aktywności telomerazy uzyskano poprzez inkubację komórek chomika chińskiego V79 z oligonukleotydem o sekwencji (TTAGGG)₄ [88]. W podobnych badaniach hamowanie aktywności w komórkach rakowych z ludzkich nerek i komórek HeLa uzyskano poprzez transfekcję retrowirusem, którego mRNA zawierało sekwencję UUAGGG komplementarną do sekwencji matrycy hTR [89]. Hamowanie aktywności telomerazy oligonukleotydami antysensowymi do hTR obserwowano także w ekstraktach ludzkiego czerniaka [90]. Przy stosowania oligonukleotydów antysensowych można rozważać dwa me-

chanizmy prowadzące do zahamowania rozwoju fenotypu inwazyjnego: indukcję apoptozy komórek rakowych i stymulację ich zwiększonego zróżnicowania [91].

Fosfotiolowe analogi oligodeoksyrybonukleotydów wiążą się znacznie silniej z jedną z domen białkowych telomerazy niż z jej RNA, zatem dla optymalnego działania terapeutycznego możliwe jest skonstruowanie chimerycznego oligonukleotydu zawierającego w części 5' modyfikację fosfotiolową, natomiast w części 3' sekwencję komplementarną do matrycy RNA [92]. Zastosowanie 19-to nukleotydowego oligonukleotydu antysensowego do komórek ludzkiego glejaka *in vitro* powodowało aktywację endorybonukleazy RNazy L, powodującej degradację RNA telomerazy [93]. Oligonukleotyd ten hamował także rozwój guzów u myszy, a mechanizmem leżącym u podstaw obserwowanego efektu była indukcja apoptozy.

Również cząsteczki katalityczne RNA (rybozomy) mogą być zastosowane do hamowania aktywności telomerazy przez sekwencyjnie specyficzne trawienie jej podjednostki RNA [94]. Katalitycznie aktywny rybozym zawierał modyfikację w postaci 2'-O-metylo rybonukleotydów, zwiększających jego stabilność i był komplementarny do podjednostki RNA ludzkiej telomerazy wykazując zależne od stężenia hamowanie aktywności telomerazy w komórkach ludzkiego glejaka. Katalitycznie nieaktywny rybozym lub rybozym z niedopasowaniem sekwencyjnym nie wykazywał takich zdolności.

Opisano szereg peptydowych analogów kwasów nukleinowych (PNA, syntetycznych oligoamidów zdolnych do tworzenia stabilnych połączeń z komplementarnymi oligonukleotydami), które pokrywały obszar matrycowy podjednostki RNA telomerazy [11, 95]. Wartości IC₅₀ dla PNA zawarte były pomiędzy 30 μM dla PNA o sekwencji 5'-TAGACA₆TG-3' komplementarnego do 3 ostatnich zasad od strony 5' matrycy i 1 nM dla 5'-TAG₃T₂AGACA₂-3' pokrywającego 9 z 11 zasad matrycy.

Powszechnie stosowany lek przeciwnowotworowy *cis*-diamminodichloroplatyna (*cis*platyna) może powodować hamowanie aktywności telomerazy w komórkach linii ludzkiego raka jajnika [96]. Interesujące, że nieaktywny przeciwnowotworowo analog *cis*platyny, *trans*-diamminodichloroplatyna (*trans*platyna), jak również doksorubicyna, bleomycyna i metotreksat nie wywierały takiego efektu. Działanie przeciwnowotworowe *cis*platyny przypisuje się tworzeniu adduktów z DNA, które zaburzają transkrypcję i translację w ulegających podziałom komórkach rakowych [97]. Jednak *trans*platyna także łączy się z

DNA z efektywnością porównywalną do cisplatyny. Być może działanie przeciwnowotworowe cisplatyny oparte jest na hamowaniu aktywności telomerazy przez tworzenie adduktów G-Pt-G z bogatymi w guaniny niemi telomerów, natomiast konfiguracja transplatyny nie sprzyja tworzeniu takich wiązań, co tłumaczyłoby jej nieefektywne działanie przeciwnowotworowe.

VIII. Uwagi końcowe

Klonowanie pojednostek RNA i katalitycznej telomerazy człowieka, identyfikacje białka stowarzyszonego z telomerazą, opracowanie metody oceny jej aktywności enzymatycznej oraz wykazanie możliwości „odmładzania” komórek są głównymi wyznacznikami dokonanego w ostatnich latach postępu w badaniach nad telomerami i telomerazą. Odkrycia te pozwalają na bardziej precyzyjne określenie udziału telomerazy w procesach starzenia i w raku. Pomimo uzasadnionego optymizmu dotyczącego diagnostyki i leczenia raków, kwestia zrozumienia mechanizmów regulujących aktywność telomerazy, zarówno na poziomie białka jak i genu(ów) pozostaje wciąż otwarta. Pomimo, że telomeraza nie wydaje się konieczna dla inicjacji transformacji nowotworowej, to dla progresji raków niezbędne jest funkcjonowanie mechanizmu zapewniającego utrzymanie długości telomerów. Pełniejsze zrozumienie i uzupełnienie telomerowej hipotezy starzenia się komórek i ich nieśmiertelności może dać narzędzia do skutecznej regulacji długości telomerów w komórkach człowieka.

Artykuł otrzymano 29 kwietnia 1999 r.

Zaakceptowano do druku 8 sierpnia 1999 r.

Piśmiennictwo

- Van Steensel B, Smogorzewska A, de Lange T (1998) *Cell* **92**: 401-413
- Hastie ND, Dempster M, Dunlop MG, Thompson AM, Green DK, Allshire RC (1990) *Nature* **346**: 866-868
- Zakian VA (1997) *Cell* **91**: 1-3
- Makarov VL, Hirose Y, Langmore JP (1997) *Cell* **88**: 657-666
- Griffith J, Bianchi A, de Lange T (1998) *J Mol Biol* **278**: 79-88
- Karlseder J, Broccoli D, Dai Y, Hardy S, de Lange T (1999) *Science* **283**: 1321-1325
- Smith S, Giriat I, Schmitt A, de Lange T (1998) *Science* **282**: 1484-1487
- Gottschling DE, Aparacio OM, Billington BL, Zakian VA (1990) *Cell* **63**: 751-762
- Williamson JR (1994) *Ann Rev Biophys Biomol Struct* **23**: 703-730
- Sundquist WI, Klug A (1989) *Nature* **342**: 825-829
- Norton JC, Piatyszek MA, Woodbring EW, Shay JW., Corey DR (1996) *Nature Biotechnol* **14**: 615-619
- Lingner J, Hendrick LL, Cech TR (1994) *Genes Dev* **8**: 1984-98
- Singer MS, Gottschling DE (1994) *Science* **266**: 404-409
- Feng J, Funk WD, Wang S-S, Weinrich SL, Avilion AA, Chiu C-P, Adams RR, Chang E, Allsopp RC, Yu J, Le S, West MD, Harley CB, Andrews WH, Greider CW, Villeponteau (1994) *Science* **269**: 1236-1241
- Hernandez N (1992) W: McKnight SL, Yamamoto KR (red) *Transcriptional regulation*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, str. 281-313
- Blasco MA, Funk B, Villeponteau B, Greider CW (1995) *Science* **269**: 1267-1270
- Soder AI, Hoare SF, Muire S, Balmain A, Parkinson EK, Keith WN (1997) *Genomics* **41**: 293-294
- Zhao JQ, Hoare SF, McFarlane R, Muir S, Parkinson EK, Black DM, Keith WN (1998) *Oncogene* **16**: 1345-1350
- Nakamura TM, Morin GB, Chapman KB, Weinrich SL, Andrews WH, Lingner J, Harley CB, Cech TR (1997) *Science* **277**: 955-959
- Meyerson M, Counter CM, Eaton EN, Ellisen LW, Steiner P, Caddle SD, Ziegler L, Beijersbergen RL, Davidoff MJ, Liu Q, Bacchetti S, Haber DA, Weinberg RA (1997) *Cell* **90**: 785-795
- Kilian A, Bowtell DDL, Abud HE, Hime GR, Venter DJ, Keese PK, Duncan EL, Reddel RR, Jefferson RA (1997) *Hum Mol Genet* **6**: 2011-2019
- Collins K, Kobayashi R, Greider CW (1995) *Cell* **81**: 677-686
- Nakayama J, Saito M, Nakamura H, Matsuura A, Ishikawa F (1997) *Cell* **88**: 875-884
- Weinrich SL, Pruzan R, Ma L, Oulette M, Tesmer VM, Holt SE, Bodnar AG, Lichtsteiner S, Kim NW, Trager JB, Taylor RD, Carlos R, Andrews WH, Wright WE, Shay JW., Harley CB, Morin GB (1997) *Nature Genet* **17**: 498-502
- Beattie TL, Zhou W, Robinson MO, Harrington L (1998) *Curr Biol* **8**: 177-180
- Nakayama J-I, Tahara H, Saito M, Ito K, Nakamura H, Nakanishi T, Tahara E, Ide T, Ishikawa F (1998) *Nature Genetics* **18**: 65-68
- Takahara M, Kyo S, Kanaya T, Hirano H, Takeda J, Yutsudo M, Inoue M (1999) *Cancer Res* **59**: 551-557
- Horikawa I, Cable PL., Afshari C, Barret JC (1999) *Cancer Res* **59**: 826-830
- Wu KJ, Grandori C, Amacker M, Simon-Vermont N, Polack A, Lingner J, Dalla-Favera R (1999) *Nature Genet* **21**: 220-224
- Harley CB (1995) W: Blackburn EH, Greider CW (red) *Telomeres*. Cold Spring Harbor Press, New York, str. 247-263.
- Jaruga E (1994) *Post Biochem* **40**: 161-165
- Kim NW, Piatyszek MA, Prowse K, Harley CB, West MD, Ho PLC, Coviello GM, Wright WE, Weinrich SC, Shay JW (1994) *Science* **270**: 2011-2015
- Blasco MA, Lee H, Hande MP, Samper E, Lansford PM, DePinho RA, Greider CW (1997) *Cell* **91**: 25-34
- Bodnar AG, Oulette M, Frolkis M, Holt SE, Chiu C, Morin GB, Harley CB, Shay JW., Lichtsteiner S, Wright EW (1998) *Science* **279**: 349-352
- Bryan TM, Englezou A, Dalla-Pozza L, Dunham MA, Reddel RR (1997) *Nature Med* **3**: 1271-1274
- Bryan TM, Marusic L, Bacchetti S, Namba M, Reddel RR (1997) *Hum Mol Genet* **6**: 921-926
- Vaziri H, Benchimol S (1998) *Curr Biol* **8**: 279-282
- Zhu J, Wang H, Bishop JM, Blackburn EH (1999) *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 3723-3728
- Morales CP, Holt SE, Oulette M, Kaur KJ, Yan Y, Wilson KS, White MA, Wright WE, Shay JW (1999) *Nature Genet* **21**: 115-118

40. Jiang XR, Jimenez G, Chang E, Frolkis M, Kusler B, Sage M, Beeche M, Bodnar AG, Wahl GM, Tlsty TD, Chiu CP (1999) *Nature Genet* **21**: 111-114
41. Vaziri H, Squire JA, Pandita TK, Bradley G, Kuba RM, Zhang H, Gulyas S, Hill RP, Nolan GP, Benchimol S (1999) *Mol Cell Biol* **19**: 2373-2379
42. Halvorsen TL, Leibowitz G, Levine F (1999) *Mol Cell Biol* **19**: 1864-1870
43. Bryan TM, Englezou A, Gupta J, Bacchetti S, Reddel RR (1995) *EMBO J* **14**: 4240-4248
44. Nakamura TM, Cooper JP, Cech TR (1998) *Science* **282**: 493-496
45. McEachern MJ, Blackburn EH (1996) *Genes Dev* **10**: 1822-1834
46. Reddel RR (1998) *Ann NY Acad Sci* **854**: 8-19
47. Sugawara O, Oshimura M, Koi M, Annab LA, Barret JC (1990) *Science* **247**: 707-710
48. Oshimura M, Barret JC (1997) *Eur J Cancer* **33**: 703-709
49. Uejima H, Mitsuya K, Kugoh H, Horikawa I, Oshimura M (1995) *Genes Chromosomes Cancer* **14**: 120-127
50. Katoh M, Katoh M, Kameyama M, Kugoh H, Shimizu M, Oshimura M (1998) *Mol Carcinogen* **21**: 17-25
51. Ogino H, Nakabayashi K, Suzuki M, Takahashi E-I, Fuji M, Suzuki T, Ayusawa D (1998) *Biochem Biophys Res Commun* **248**: 223-227
52. Martens UMM, Zijlmans MJM, Poon SSS, Dragowska W, Yui J, Chavez EA, Ward RK, Lansdorp PM (1998) *Nature Genet* **18**: 76-80
53. Shay JW (1997) *J Cell Physiol* **173**: 266-270
54. Wynford-Thomas D (1997) *Eur J Cancer* **33**: 716-726
55. Holt SE, Wright WE, Shay JW (1997) *Eur J Cancer* **33**: 761-766
56. Landberg G, Roos G (1997) *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand* **105**: 575-589
57. Roos G, Nilsson P, Cajander S, Nielsen N-H, Arnerlov C, Landberg G (1998) *Int J Cancer* **79**: 343-348
58. Shay JW, Tomlinson G, Piatyszek MA, Gollahon LS (1995) *Mol Cell Biol* **15**: 425-432
59. Mandal M, Kumar R (1997) *J Biol Chem* **272**: 14183-14187
60. Fu W, Begley JG, Killen MW, Mattson MP (1999) *J Biol Chem* **274**: 7264-7271
61. Greenberg RA, O'Hagan RC, Deng H, Xiao Q, Hann SR, Adams RR, Lichtsteiner S, Chin L, Morin GB, DePinho RA (1999) *Oncogene* **18**: 1219-1226
62. Li H, Zhao L, Yang Z, Funder JW, Liu JP (1998) *J Biol Chem* **273**: 33436-33442
63. Cuthbert AP, Bond J, Trott DA, Gill S, Broni J, Marriott A, Khoudoli G, Parkinson EK, Cooper CS, Newbold RF (1999) *J Natl Cancer Inst* **91**: 37-45
64. Shay JW, Wright WE (1996) *Curr Opin Oncol* **8**: 66-71
65. Yamada O, Motoji T, Mizoguchi H (1996) *Biochem Biophys Acta* **1314**: 260-266
66. Taylor RS, Ramirez RD, Ogoshi M, Caffins M, Piatyszek MA, Shay JW (1996) *J Invest Dermatol* **106**: 759-765
67. Kim NW (1997) *Eur J Cancer* **33**: 781-786
68. Yasui W, Tahara H, Tahara E, Fujimoto J, Nakayama J, Ishikawa F, Ide T, Tahara E (1998) *Jpn J Cancer Res* **89**: 1099-1103
69. Tahara H, Yasui W, Tahara E, Fujimoto J, Ito K, Tamai K, Nakayama J, Ishikawa F, Tahara E, Ide T (1999) *Oncogene* **18**: 1561-1567
70. Iiyama E, Iiyama K, Yokoyama T, Fukuba I, Yamaoka H, Shay JW, Matsuura Y (1995) *Clin Cancer Res* **5**: 601-609
71. Eisen A, Weber BL (1998) *Curr Opin Oncol* **10**: 486-91
72. Fossel M (1998) *JAMA* **279**: 1732-1735
73. Tatematsu M, Ishikawa F (1996) *Oncogene* **13**: 2256-2274
74. Maitra A, Yashima K, Rathi A, Timmons CF, Rogers BB, Shay JW, Gazdar AF (1999) *Cancer* **85**: 741-749
75. Lingner J, Hughes TR, Shevchenko A, Mann M, Lundblad V, Cech TR (1997) *Science* **276**: 561-577
76. Strahl C, Blackburn EH (1996) *Mol Cell Biol* **16**: 53-65
77. Yegorov YE, Chernov DN, Akimov SS, Bolsheva NL, Krayevsky AA, Zelenin AV (1996) *FEBS Lett* **389**: 115-118
78. Perry PJ, Gowan SM, Reszka AP, Polucci P, Jenkins TC, Kelland LR, Neidle S (1998) *J Med Chem* **41**: 3253-3260
79. Van Steensel B, de Lange T (1997) *Nature* **385**: 740-743
80. Harrington L, McPhail T, Mar V, Zhou W, Oulton R, Bass MB, Arruda I, Robinson MO (1997) *Science* **275**: 973-977
81. Li H, Zhao L-L, Funder JW, Liu J-P (1997) *J Biol Chem* **272**: 16729-16732
82. Escude C, Nguyen CH, Kukreti S, Janin Y, Sun JS, Bisagni E, Garestier T, Helene C (1998) *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 3591-3596
83. Fedoroff OY, Salazar M, Han H, Chemeris VV, Kerwin SM, Hurley LH (1998) *Biochemistry* **37**: 12367-12374
84. Chen Q, Kuntz ID, Shafer RH (1996) *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 2635-2639
85. Anantha NV, Azam N, Sheardy RD (1998) *Biochemistry* **37**: 2709-2714
86. Izbicka E, Wheelhouse RT, Raymond E, Davidson KK, Lawrence RA, Sun D, Windle BE, Hurley LH, Von Hoff DD (1999) *Cancer Res* **59**: 639-644
87. Mergny J-L, Helene C (1998) *Nature Med* **4**: 1366-1367
88. Pandit B, Bhattacharyya NP (1998) *Biochem Biophys Res Commun* **251**: 620-624
89. Bisoffi M, Chakerian AE, Fore ML, Bryant JE, Hernandez JP, Moyzis RK, Griffith JK (1998) *Eur J Cancer* **34**: 1242-1249
90. Glukhov AI, Zimnik OV, Gordeev SA, Severin SE (1998) *Biochem Biophys Res Commun* **248**: 368-371
91. Kondo S, Kondo Y, Li G, Silverman RH, Cowell JK (1998) *Oncogene* **16**: 3323-3330
92. Matthes E, Lehmann C (1999) *Nucleic Acid Res* **27**: 1152-1158
93. Kondo S, Tanaka Y, Kondo Y, Hitomi M, Barnett GH, Ishizaka Y, Liu J, Haqqi T, Nishiyama A, Villeponteau B, Cowell JK, Barna BP (1998) *FASEB J* **12**: 801-811
94. Wan MSK, Fell PL, Akhtar S (1998) *Antisense Nucleic Acid Drug Develop* **8**: 309-317
95. Hamilton SE, Pitts AE, Katipally RR, Jia X, Rutter JP, Davies BA, Shay JW, Wright WE, Corey DR (1997) *Biochemistry* **36**: 11873-11880
96. Burger AM, Double JA, Newell DR (1997) *Eur J Cancer* **33**: 638-644
97. Bernal-Mendez E, Boudvillan M, Gonzalez-Vilchez F, Leng M (1997) *Biochemistry* **36**: 7281-7287
98. Boral AL, Dessain S, Chabner B (1998) *Cancer Chemother Pharmacol* **42**: S3-S21

Integryny i ich znaczenie w progresji nowotworów złośliwych

Integrins and their role in cancer progression

JANUSZ BŁASIAK¹, JOLANTA NIEWIAROWSKA²,
MARCIN CIEŚLAK³, CZESŁAW S. CIERNIEWSKI⁴

Spis treści:

- I. Wprowadzenie
- II. Ogólna charakterystyka integryn
 - II-1. Rozpoznawanie ligandów
 - II-2. Przesyłanie sygnałów
 - II-3. Rola w adhezji i migracji komórek
- III. Integryny komórek rakowych
 - III-1. Ekspresja w komórkach rakowych
 - III-2. Udział w angiogenezie i apoptozie komórek rakowych
- IV. Rola integryn w progresji nowotworów złośliwych
 - IV-1. Udział w inwazji i metastazie
 - IV-2. Związek z układem aktywacji plazminogenu
 - IV-3. Znaczenie prognostyczne i terapeutyczne
- V. Ekspresja integryn jako cel antysensowej terapii przeciwnowotworowej
 - V-1. Przeciwnowotworowe strategie antysensowe w chorobach nowotworowych
 - V-2. Strategie antysensowe skierowane na ekspresję integryn
- VI. Uwagi końcowe

Contents:

- I. Introduction
- II. General properties of integrins
 - II-1. Ligand recognition
 - II-2. Signalling
 - II-3. Role in cell adhesion and migration
- III. Integrins of cancer cells
 - III-1. Expression in cancer cells
 - III-2. Role in angiogenesis and apoptosis of cancer cells
- IV. Role of integrins in cancer progression
 - IV-1. Function in invasion and metastasis
 - IV-2. Association with the plasminogen activation system
 - IV-3. Prognostic and therapeutic potential
- V. Integrin expression as a target for antisense anti-invasive therapy
 - V-1. Antisense strategies against cancer invasion
 - V-2. Antisense strategies targeted at integrin expression
- VI. Concluding remarks

Wykaz stosowanych skrótów: bc1-2 — białko kontrolujące apoptozę; EGF — naskórkowy czynnik wzrostu; FAK — kinaza ogniskowych połączeń adhezyjnych; ECM — macierz zewnątrzkomórkowa; IGF-1 — insulinopodobny czynnik wzrostu 1; KQAGD — sekwencja aminokwasowa Lys-Gln-Ala-Gly-Asp; ODN — niemodyfikowane oligodeoksyrybonukleotydy; p21(kip1) — inhibitor cyklu komórkowego; p225 — podjednostka α_5 , o masie 225 kDa; p59ILK — związana z integrynami kinaza białkowa o masie 59 kDa; PAI-1 — inhibitor aktywatorów plazminogenu typu 1; PS-ODN — fosfotiolowe analogi oligodeoksyrybonukleotydów; RGD — sekwencja aminokwasowa Arg-Gly-Asp; Src, Syk — kinazy tyrozynowe; TGF- β — transformujący czynnik wzrostowy β ; uPA — aktywator plazminogenu typu urokinazowego, urokinaza; uPAR — receptor aktywatora plazminogenu typu urokinazowego; VCAM-1 —

adhezyjne białko komórek naczyniowych-1; VLA — najpóźniej aktywowane antygeny.

I. Wprowadzenie

Migracja komórek odgrywa istotną rolę w przebiegu wielu procesów tak fizjologicznych, jak i patologicznych, w tym w inwazji i metastazie nowotworów złośliwych. Mechanizmy leżące u podstaw migracji nie są w pełni poznane, nie ma jednak wątpliwości, że krytyczną rolę odgrywa w nich kontrolowana adhezja komórek do elementów macierzy zewnątrzkomórkowej (ECM) oraz innych komórek. Adhezję komórek można, w dużym uproszczeniu, sprowadzić do oddziaływania receptorów adhezyjnych błony komórkowej z wysokocząsteczkowymi ligandami. Głównymi receptorami adhezyjnymi są kompleksy glikoproteinowe zwane integrynami dla podkreślenia ich roli w integracji macierzy zewnątrzkomórkowej i cytoplazmatycznej.

Integryny mogą wykazywać aktywność zarówno wewnątrz, jak i na zewnątrz komórki. Główną funk-

¹Dr hab., Katedra Genetyki Molekularnej Uniwersytetu Łódzkiego, Banacha 12/16, 90-237 Łódź; ²dr, Zakład Biofizyki, Instytut Biochemii i Fizjologii, Akademia Medyczna w Łodzi, Lindleya 3, 90-131 Łódź; ³mgr, Zakład Chemii Bioorganicznej, Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych, PAN, ul. Sienkiewicza 112, 90-363 Łódź; ⁴prof. dr hab., Zakład Biofizyki, Instytut Biochemii i Fizjologii, Akademia Medyczna w Łodzi, Lindleya 3, 90-131 Łódź

cją integrzyn jest rozpoznawanie adhezyjnych białek ECM, takich jak fibrynogen, fibronektyna, witronektyna, kolagen i VCAM-1 [1]. Wiele z nich rozpoznaje krótkie sekwencje aminokwasowe, najczęściej RGD (Arg-Gly-Asp), ale także KQAGD (Lys-Gln-Ala-Gly-Asp) i LDV (Leu-Asp-Val) [2,3].

Integryny pośredniczą w przekazywaniu informacji z ECM do komórki i w kierunku przeciwnym, między innymi przez zmiany stężenia jonów wapnia oraz aktywację białkowej kinazy C i kinaz tyrozynowych, zwłaszcza FAK, Src i Syk [4-6], a także hamującego apoptozę białka bcl-2 [7]. Kluczowe znaczenie integrzyn dla przebiegu adhezji i migracji komórek oraz udział w przekazywaniu sygnałów kontrolujących ekspresję wybranych genów sprawia, że receptory te mogą być rozważane jako tarcza w leczeniu chorób, u podłoża których leżą zaburzenia ich funkcji i ekspresji.

II. Ogólna charakterystyka integrzyn

II-1. Rozpoznawanie ligandów

Integryny są glikoproteinami błonowymi składającymi się z dwóch podjednostek, α i β . Masa cząsteczkowa podjednostek waha się między 90 kDa i około 200 kDa. Każda z nich jest białkiem transbłonowym o dużej domenie zewnątrzkomórkowej i mniejszej cytoplazmatycznej; wyjątkiem jest β_4 , której domena cytoplazmatyczna przyjmuje znaczne rozmiary. Miejsce wiązania ligandów stanowią sekwencje domen zewnątrzkomórkowych obu podjednostek, domeny cytoplazmatyczne zaś łączą się z cytoszkieletem [8-10]¹.

Dotychczas zidentyfikowano 17 podjednostek α i 8 β , mogących tworzyć ponad 20 kompleksów [10, 11]. Podczas gdy w komórkach wielu typów integryny podrodziny β_1 są aktywowane konstytutywnie, wiązanie ligandów przez integryny podrodziny β_1 i β_2 różnych rodzajów leukocytów oraz przez płytkowy receptor fibrynogenu, $\alpha_{IIb}\beta_3$, wymaga aktywacji [12]. Specyficzność wiązania ligandów przez integryny zależy od typu komórki, np. w płytkach krwi integryna $\alpha_2\beta_1$ jest receptorem kolagenu, ale w niektórych komórkach oprócz kolagenu wiąże lamininę i fibronektynę [13]. Wiązanie liganda przez integrynę prowadzi do zmiany jej konformacji oraz rozkładu integrzyn na powierzchni komórki: integryny przemieszczają się w płaszczyźnie błony i gromadzą w różnych obszarach, zwłaszcza w miejscach

kontakty z macierzą lub innymi komórkami. W efekcie powstają wielocząsteczkowe skupiska łączące białka zewnątrz- i wewnątrzkomórkowe. Dynamika powstawania tych skupisk decyduje o migracyjnym fenotypie komórek. Aktywacja receptorów integrzynowych z sukcesywnym powstawaniem punktowych przyczepów uruchamia kaskadę wtórnych zdarzeń informacyjnych. Najważniejszym wtórnym przekaznikiem wydaje się być kinaza ogniskowych połączeń adhezyjnych, FAK [1, 14, 15]. Można zakładać, że ruch komórek odbywa się poprzez ciągłą indukcję powstawania punktowych przyczepów na krawędzi wiodącej komórki i reorganizację cytoszkieletu.

Komórki poszczególnych typów na ogół różnią się liczbą integrzyn — od kilku do kilkunastu na komórkę [16, 17]. W komórkach typu nabłonkowego liczba i rodzaj receptorów integrzynowych są różne na powierzchni bazalnej i apikalnej. W komórkach niektórych typów rodzaj występujących integrzyn jest ściśle powiązany z wykonywaną funkcją, i tak na przykład $\alpha_{IIb}\beta_3$, syntetyzowana w megakariocytach, jest przekazywana płytkom krwi, aby brać udział w ich agregacji i adhezji [12]. Na poziom ekspresji integrzyn wpływ ma wiele czynników, m.in. związki wpływające na proliferację i różnicowanie komórek [3]. Wśród tych czynników znajdują się głównie cytokiny: czynniki wzrostu (TGF β , PDGF-ab, PDGF-bb, EGF, NGF, aFGF, bFGF), interleukiny (IL-4, IL-1 β , IL-6), interferon γ , rodzina β chemokin (MPC-1, MIP-1 α , RANTES), czynniki martwicy nowotworów (TNF- α , TNF- β), hormony oraz lipopolisacharydy bakteryjne (LPS, endotoksyny). Dotychczas opisano również kilkanaście substancji farmakologicznych wpływających na ekspresję receptorów integrzynowych. Są nimi związki działające na poziomie przekazywania sygnału, bądź indukujące różnicowanie komórek: estry forbolu, genysteina — inhibitor kinaz tyrozynowych, forskolina — podwyższająca poziom cAMP, gosypol — bifenolowy składnik z drzewa *Portia*, talidomid i deksametazon. Doniesienia ostatnich lat wskazują również na niewątpliwy wpływ wielu infekcji wirusowych (*Pneumocystis carinii*, HIV i cytomegalo).

II-2. Przesyłanie sygnałów

Komórki śródbłonna są zdolne do migracji w ECM przy udziale odpowiednio integrzyn $\alpha_v\beta_3$ i $\alpha_2\beta_1$ i bez udziału jakichkolwiek cytokin, czynników

¹Podstawowe cechy strukturalne i funkcyjne integrzyn zostały opisane w „Postęпах Biochemii” numer 40(1) z 1994 roku.

wzrostu czy chemoatraktantów [18]. Jony wapnia są niezbędne do aktywacji szlaku przenoszenia sygnałów zależnego od białkowej kinazy C przez receptor naskórkowego czynnika wzrostu (EGF), w wyniku czego dochodzi do, zależnej od $\alpha_5\beta_1$, migracji komórek w witroniektynie. Przesyłanie sygnałów przy udziale integrzyn może zachodzić poprzez oddziaływanie kinazy białkowej związanej z integrzynami o masie 59 kDa, p59ILK, która może fosforylować domenę cytoplazmatyczną podjednostki β_1 [19]. Nadmierna ekspresja p59ILK powoduje zaburzenia struktury komórek śródbłonna i hamowanie wiązania integrzyn z substratami z jednoczesną indukcją wzrostu komórek niezależnego od ich zakotwiczenia. Dla przenoszenia sygnałów związanych ze zmianami stężenia Ca^{2+} przy udziale integrzyn zasadnicze znaczenie ma kalretikulina, która może także wpływać na funkcje adhezyjne integrzyn [20]. Aktywacja integrzyn pod wpływem sygnałów przesyłanych z wnętrza komórki przez interl ukinę 3 może zachodzić przy udziale białka H-Ras [21].

Integryny nie wykazują aktywności kinazowej, a mimo to wywołują aktywację białek Ras i kolejno: Raf, MEK i MAPK [22]. Podobnie do receptorów sprzężonych z białkami G, przesyłanie sygnału indukowane przyłączeniem liganda do receptorów integrzynowych wiąże się z aktywacją rozpuszczalnych kinaz tyrozynowych. Te następnie, tworząc kompleks z cytoplazmatycznym regionem podjednostek β (β_1 , β_2 i β_3) receptorów integrzynowych, fosforylują je [23].

Dotychczasowe obserwacje pozwalają sądzić, że pierwsza faza przesyłania sygnału od receptorów integrzynowych do wnętrza płytek, w wyniku której zachodzi aktywacja białek Ras, może zachodzić z udziałem: (a) kinazy FAK [24]. Wiadomo, że FAK może tworzyć kompleks z cytoplazmatyczną domeną podjednostki β oraz z białkiem adaptorowym Grb2 [25] i dzięki niemu przyłączać się do aktywatorów białek Ras, takich jak Sos lub Vav, co prowadzi do aktywacji Ras; (b) kinaz Src, Syk lub Lyn. Kinazy te mogą tworzyć kompleks z cytoplazmatycznym regionem podjednostki β_3 receptora fibrynogenu i fosforylować resztę tyrozynową. Taka reakcja ma miejsce podczas agregacji płytek krwi [26]. Podjednostka ta ulega fosforylacji z udziałem kinaz Src, Syk i w mniejszym stopniu Lyn również w warunkach *in vitro*. Co więcej, z ufosforylowaną domeną cytoplazmatyczną tej podjednostki kolejno tworzą kompleks: białko Shc, Grb2 i Sos, które z kolei aktywuje białko Ras [27]; (c) cytoszkieletu. Receptory płytkowe są połączone z cytoszkieletem zarówno w czasie spoczynku, jak i po aktywacji. Uaktywnienie podsta-

wowej integryny płytkowej, $\alpha_{IIb}\beta_3$, prowadzi do reorganizacji cytoszkieletu i zmiany właściwości płytek krwi. W pierwszym etapie dochodzi najczęściej do agregacji receptorów, przyłączania białek cytoszkieletu i białek systemu sygnalizacyjnego, a także tworzenia skupisk fibrylarnych. W kompleksy cytoszkieletowo-integrzynowe wbudowanych zostaje wiele innych białek, w tym kinazy Src [28, 29], Syk [30], FAK [31], białka z domenami SH2 i SH3 oraz inne, fosforylowane w resztach tyrozynowych a także białka nadrodziny Ras [32].

II-3. Rola w adhezji i migracji komórek

Macierz zewnątrzkomórkowa nie jest strukturą statyczną — podlega nieustannym procesom przebudowy, w których biorą udział integryny. Tym samym, białka te wpływają na reorganizację ECM. Przykładem jest udział integryny $\alpha_5\beta_1$ w wydzielaniu przez komórki fibronektyny i odkładanie tego białka w ECM [16]. Mechanizm leżący u podstaw przebudowy ECM przez $\alpha_5\beta_1$ może polegać na zagęszczaniu fibronektyny na powierzchni komórek oraz zmianie jej konformacji, w wyniku czego możliwe staje się wprowadzenie tego białka do włókien macierzy. Podobne działanie w odniesieniu do kolagenu i ECM wykazuje integryna $\alpha_2\beta_1$ [33].

Adhezja komórek do ECM, odbywająca się głównie przy udziale integrzyn, ma podstawowe znaczenie dla wypełniania elementarnych funkcji przez komórki. Komórki prawidłowe *in vitro* mogą właściwie dzielić się i funkcjonować dopiero po przyłączeniu się do stałego podłoża. Od adhezji zależy również proliferacja i różnicowanie komórek, które zachodzą przy współdziałaniu sygnałów pochodzących od integrzyn [34]. Dzięki udziałowi w procesach adhezji receptory integrzynowe mogą wpływać na migrację komórek, wyznaczając jej kierunek, szybkość oraz cel. Komórki przemieszczają się po powierzchniach pokrytych białkami macierzowymi, a w przypadku pojawienia się niejednorodności, poruszają się w kierunku wyznaczonym przez wyższe stężenie [11], przy czym zbyt duży gradient stężenia białek ECM może zwolnić ich migrację [35].

III. Integryny komórek rakowych

III-1. Ekspresja w komórkach rakowych

Integryna $\alpha_{IIb}\beta_3$ została po raz pierwszy zidentyfikowana w płytkach krwi [6], w których, na skutek wiązania fibrynogenu, umożliwia agregację i bierze udział w przesyłaniu sygnałów zarówno z wnętrza

komórki na zewnątrz, jak i w kierunku przeciwnym [36]. Gen α_{11b} znajduje się pod ścisłą kontrolą transkrypcyjną jedynie w megakariocytach, podczas gdy ekspresja genu integryny β_3 jest rozpowszechniona w wielu komórkach [37]. W większości komórek, w tym również w komórkach nowotworowych, zamiast podjednostki integryny α_{11b} występuje podjednostka α_V , a w miejsce receptora integryny $\alpha_{11b}\beta_3$ pojawia się receptor $\alpha_V\beta_3$. Oba receptory tworzą podrodzinę cytoadhezyn. W wielu pracach opisujących komórki nowotworowe, receptory te nie zostały do końca scharakteryzowane. Najczęściej podczas identyfikacji używa się przeciwciał skierowanych przeciwko $\alpha_{11b}\beta_3$, a wykryte integryny określa mianem białek antygenowo spokrewnionych z $\alpha_{11b}\beta_3$. Sugeruje to występowanie integryn $\alpha_{11b}\beta_3$, bądź receptorów z nimi spokrewnionych w komórkach eukariotycznych. Istnieje duże prawdopodobieństwo, iż tymi integrynami reagującymi krzyżowo z przeciwciałami skierowanymi przeciwko $\alpha_{11b}\beta_3$ są receptory $\alpha_V\beta_3$. Jest prawdopodobne, że w wyniku zdarzeń związanych z transformacją nowotworową, w niektórych guzach następuje podwyższenie poziomu transkrypcji genu α_V . Receptor ten umożliwia komórkom oddziaływanie z organizmem gospodarza w sposób analogiczny do płytek i w rezultacie ułatwia metastazę [37, 38]. W interakcjach między komórkami nowotworowymi a komórkami śródbłonka i ECM integryna $\alpha_V\beta_3$ odgrywa podobną rolę do $\alpha_{11b}\beta_3$ w płytkach krwi [39-41].

Wyniki badań zależności pomiędzy strukturą i funkcją obu cytoadhezyn sugerują, że mogą one występować w dwóch stanach: aktywnym i nieaktywnym [36, 42, 43]. Agregacja i adhezja płytek zachodzi przy udziale integryny $\alpha_{11b}\beta_3$ w aktywnej konformacji, natomiast nie określano dotychczas konformacji $\alpha_V\beta_3$, w której zachodzą oddziaływanie komórek rakowych z ECM. Ekspresję integryny $\alpha_V\beta_3$ stwierdzono w szeregu komórek nowotworowych, między innymi w czerniaku, gruczolorku prostaty [44], raku sutka [45] i jelita grubego [46]. Dalsze badania powinny przynieść wyjaśnienie, czy faktycznie gen, o którym wiadomo, że podlega ścisłej megakariotycznej kontroli transkrypcji, ulega ekspresji w komórkach nie wywodzących się z megakariocytów, czy też wykrywane receptory to $\alpha_V\beta_3$.

W komórkach ludzkiego raka trzustki, w których brak jest ekspresji integryny $\alpha_V\beta_3$, pierwotnym i podstawowym receptorem witronektyny jest integryna $\alpha_V\beta_5$. Komórki te nie są zdolne do tworzenia kontaktów zogniskowanych do witronektyny i tym samym nie mogą w niej migrować. Mogą to czynić przy udziale kolagenu, z zaangażowaniem integryn

rodziny β_1 [47]. W wyniku transfekcji tych komórek cDNA kodującym podjednostkę β_3 uzyskano powierzchniową ekspresję funkcjonalnej integryny $\alpha_V\beta_3$, w następstwie czego komórki nabywały nowe właściwości adhezyjne, szczególnie możliwości migracji na witronektynie. Zatem podjednostki β_3 i β_5 , po połączeniu się z podjednostką α_V , mogą stymulować zróżnicowaną reakcję komórki wywołaną obecnością witronektyny w środowisku zewnątrzkomórkowym.

III-2. Udział w angiogenezie i apoptozie komórek rakowych

Angiogeneza — wytwarzanie nowych naczyń krwionośnych z naczyń już istniejących — może być zarówno procesem fizjologicznym (rozwój embryonalny, cykle rozrodcze u kobiet czy gojenie się ran), jak i patologicznym, promującym proliferację i inwazję komórek rakowych. W procesie tym bierze udział kilka rodzajów komórek, wśród których komórki śródbłonka odgrywają kluczową rolę. Podczas wytwarzania nowych naczyń krwionośnych uczestniczą one w proteolitycznej degradacji ECM, migrują do przestrzeni okołonaczyniowej, intensywnie proliferują oraz oddziałują ze sobą [48]. Badania *in vitro* i *in vivo* wykazały, że procesy te mogą zachodzić dzięki obecności receptorów integrynowych, zwłaszcza należących do rodziny α_V . Przeciwciała skierowane przeciwko integrynom $\alpha_V\beta_5$ hamują angiogenezę indukowaną VEGF, TGF α i estrami forbolu, natomiast skierowane przeciwko $\alpha_V\beta_3$ — pobudzają przez bFGF i TNF α . Hamowanie angiogenezy wywołanej tymi ostatnimi czynnikami obserwowano również po zastosowaniu syntetycznych peptydów zawierających sekwencję RGD. W angiogenezie indukowanej VEGF, poza integryną $\alpha_V\beta_5$, uczestniczą receptory dla kolagenu: $\alpha_1\beta_1$ i $\alpha_2\beta_1$ [49], co potwierdziły rezultaty badań, w których zastosowanie przeciwciał skierowanych przeciwko integrynom α_1 i α_2 spowodowało obniżenie adhezji komórek endotelialnych do kolagenu typu I, typu IV i lamininy-1.

Receptory integrynowe uczestniczą w przesyłaniu informacji ze środowiska zewnętrznego do komórki i odwrotnie. Rozpuszczalne przeciwciała lub peptydy zawierające sekwencję RGD działają antagonistycznie wobec $\alpha_V\beta_3$, indukują apoptozę angiogennych komórek śródbłonka. Oddziaływanie integryn $\alpha_V\beta_3$ z elementem macierzy zewnątrzkomórkowej wydaje się więc być niezbędnym do generowania antyapoptotycznego sygnału wewnątrz komórki. Ponadto, integryna $\alpha_V\beta_3$ reguluje aktywność kinazy MAP kon-

trulującej procesy proliferacji, migracji i różnicowania komórek, a więc procesy o podstawowym znaczeniu dla angiogenezy. Zastosowanie antagonistów $\alpha_v\beta_3$ powoduje obniżenie aktywności tej kinazy, co w konsekwencji prowadzi do zahamowania angiogenezy [50]. W intensywnie proliferujących komórkach śródbłonna blokowanie wiązania $\alpha_v\beta_3$ z ligandem powoduje wzrost aktywności białka p53 oraz wzrost ekspresji genu $p21^{WAF1/CIP1}$ [51]. Białkowy produkt tego genu wiąże się z kompleksami cykлина/kinaza zależna od cykliny i inaktywuje je, blokując komórki w fazie G_1 cyklu komórkowego [52]. Podwyższona ekspresja $p21^{WAF1/CIP1}$ prowadzi do apoptozy proliferujących komórek nabłonkowych gruczołu sutkowego, co wskazuje na bezpośredni udział p21 w tym procesie [53]. Oddziaływanie śródbłonkowej $\alpha_v\beta_3$ z ligandem prowadzi natomiast do większej ekspresji czynnika antyapoptotycznego, białka bcl-2 oraz do jednoczesnego obniżenia ekspresji czynnika proapoptotycznego, białka bax [51]. Białko bcl-2 tworząc kompleksy z białkiem bax, wydłuża czas życia komórek.

Istotnym zjawiskiem podczas angiogenezy jest ukierunkowana migracja komórek śródbłonna, która zależy od proteolizy białek tworzących macierz zewnątrzkomórkową. Za proteolizę białek ECM odpowiedzialne są głównie metaloproteazy. Integryna $\alpha_v\beta_3$ ułatwia degradację białek ECM poprzez wiązanie metaloproteazy-2 (MMP-2). W doświadczeniach *in vivo* wykazano współwystępowanie $\alpha_v\beta_3$ i MMP-2 na powierzchni angiogennych komórek naczyń [54]. Ponadto, transfekcja cDNA podjednostki β_3 do komórek czerniaka CS-1 zawierających podjednostkę α_v umożliwia wiązanie rozpuszczalnego, rekombinowanego białka MMP-2. W oddziaływaniu $\alpha_v\beta_3$ z MMP-2 uczestniczy C-końcowy fragment MMP-2, nie wykazujący aktywności proteolitycznej [55]. Fragment ten hamuje angiogenezę indukowaną bFGF oraz hamuje wzrost guzów nowotworowych, co stanowi kolejny dowód na to, że oddziaływanie $\alpha_v\beta_3$ z MMP-2 ma istotne znaczenie dla angiogenezy.

Adhezja z udziałem integryn może zapobiegać apoptozie komórek nowotworowych. Komórki ludzkiego szpiczaka odporne na apoptozę indukowaną przez doksorubicynę wykazują zwiększoną ekspresję receptora fibronektyny $\alpha_4\beta_1$ [56]. Przeciwciała skierowane przeciwko α_v wywołują natomiast apoptozę w komórkach ludzkiego raka jelita grubego [57], a zwiększona ekspresja receptora fibronektyny $\alpha_5\beta_1$ hamuje ich apoptozę [58].

Peptydy zawierające motyw RGD są zdolne do bezpośredniej indukcji apoptozy bez udziału inte-

gryn na skutek przekształcania i aktywacji enzymatycznej prokaspazy-3, białka o właściwościach proapoptotycznych [59]. Odkrycie to może stanowić wytłumaczenie właściwości proapoptotycznych peptydów RGD w angiogenezie, stanach zapalnych i metastazie.

IV. Rola integryn w progresji nowotworów

Inwazja i metastaza nowotworów są złożonymi procesami, u podstaw których leży oddziaływanie komórek rakowych z komórkami prawidłowymi i składnikami ECM [60]. Oddziaływania te zachodzą przy udziale komórkowych receptorów adhezyjnych: kadheryn, selektyn, adhezyn i integryn [38].

IV-1. Udział w inwazji i metastazie

Przyczyną ukierunkowanej siły działającej na komórki nowotworowe i powodującej ich migrację może być chemotaksja, odgrywająca główną rolę np. w migracji przez fibronektynę komórek glejaka podczas jego inwazji [61]. Komórki raka prostaty mogą tworzyć przerzuty do kośćca, przy czym istotne znaczenie dla tego procesu odgrywałaby adhezja komórek rakowych do komórek szpiku kostnego zachodząca głównie przy udziale integryny $\alpha_2\beta_1$ [62]. Wprowadzenie monoklonalnych przeciwciał 17E6 skierowanych przeciwko integrynie $\alpha_v\beta_3$ powoduje natomiast hamowanie powstawania przerzutów w płucach myszy z wstrzykniętymi komórkami ludzkiego czerniaka M21 [63].

Zróżnicowany poziom ekspresji podjednostek α_v , β_3 , β_1 i β_5 stwierdzono w komórkach pochodzących z guzów mózgu o różnym stopniu złośliwości [64]. Podjednostka α_v ulega ekspresji niezależnie od stopnia zróżnicowania, podobnie jak β_1 , natomiast ekspresja β_3 ma miejsce jedynie w komórkach słabo zróżnicowanych, o dużym potencjale inwazyjnym.

Wykonano szereg badań zmierzających do określenia związków pomiędzy ekspresją receptorów lamininy i progresją raków. Po transformacji chemicznej różnych rodzajów komórek człowieka stwierdzono ponad dziesięciokrotny wzrost poziomu ekspresji receptorów integrynowych lamininy i kolagenu: $\alpha_6\beta_1$, $\alpha_2\beta_1$ i $\alpha_1\beta_1$, przy niezmienionej ekspresji receptorów fibronektyny [65]. Wyniki badań przeprowadzonych na komórkach pochodzących z raków przewodu pokarmowego sugerują istnienie korelacji pomiędzy poziomem ekspresji receptorów lamininy i zajęciem węzłów chłonnych okolicy guza oraz powstawaniem odległych przerzutów [66]. Wysoki poziom ekspresji integryny $\alpha_6\beta_1$ stwierdzono w liniach

komórek czerniaka B16/129 o wysokiej zdolności do tworzenia przerzutów [67]. Na podkreślenie zasługują wyniki badań, w których obserwowano prawidłowy poziom ekspresji receptora lamininy, $\alpha_6\beta_4$, w przerzutach komórek raka sutka do okolicznych węzłów chłonnych. Jednocześnie poziom tej integryny w komórkach raka pierwotnego i odległych przerzutach był obniżony [68, 69]. Wytlumaczeniem tego zróżnicowania może być albo selekcja klonalna, albo wpływ na ekspresję $\alpha_6\beta_4$ bezpośredniego otoczenia komórek rakowych w organizmie gospodarza.

IV-2. Związek z układem aktywacji plazminogenu

Inhibitor aktywatorów plazminogenu typu 1 (PAI-1), odgrywa ważną rolę w progresji nowotworów i w wielu rodzajach raka jest uznanym markerem prognostycznym, pozwalającym na zaliczenie pacjentów do grupy wysokiego, bądź niskiego ryzyka [70, 71]². PAI-1 może brać udział w migracji komórek także poprzez mechanizmy nie związane z aktywacją plazminogenu: może hamować migrację komórek ludzkiego raka skóry, przy czym hamowanie to ma miejsce nawet wówczas, gdy bierze w nim udział zmutowane białko PAI-1, pozbawione funkcji inhibitora aktywatorów plazminogenu [72]. PAI-1 specyficznie zaburza migrację komórek zachodzącą przy udziale integryn i witronektyny, natomiast nie wykazuje takiego działania w odniesieniu do migracji przy udziale fibronektyny. Mechanizmem leżącym u podstaw tych efektów jest prawdopodobnie współzawodniczenie tego białka z witronektyną o wiązanie z integrynami. Również inny składnik układu aktywacji plazminogenu, receptor aktywatora plazminogenu typu urokinazowego (uPAR), mający duże znaczenie w progresji nowotworów, może się wiązać z niektórymi członkami podrodzin β_1 i β_3 linii komórek włókniakomięsaka [73].

IV-3. Znaczenie prognostyczne i terapeutyczne

Wartość kryteriów morfologicznych w prognozowaniu przebiegu czerniaka jest raczej ograniczona, wobec czego poszukuje się nowych wyznaczników prognostycznych tej choroby. Ekspresję integryn rodziny β_3 można wiązać ze zwiększonym szansą przerzutów do płuc, natomiast ekspresja β_1 koreluje z prawdopodobieństwem zajęcia okolicznych węzłów

chłonnych [74, 75]. Ekspresja integryn β_3 i β_1 może być zatem markerem prognostycznym czerniaka. Ekspresja receptorów witronektyny na powierzchni komórek czerniaka linii MeWo podlega regulacji przez kwas retinolowy [76]. Związek ten powoduje zwiększenie poziomu mRNA integryny α_v , podwyższoną adhezję komórek rakowych do ECM oraz zmniejszoną proliferację, może zatem być brany pod uwagę w terapii przeciwrakowej. Zdolność tworzenia przerzutów do kości przez komórki raka sutka jest zależna od ekspresji podjednostki β_1 oraz α_2 , α_3 i α_5 [77].

W niektórych komórkach raka prostaty, w których ma miejsce ekspresja integryny $\alpha_3\beta_1$, występuje odmienna forma podjednostki α_3 o masie cząsteczkowej około 225 kDa (p225), bezpośrednio związana z podjednostką β_1 [78]. Białko p225 składa się z ciężkiego łańcucha podjednostki α_3 połączonej wiązaniem disiarczkowym z monomerem receptora transferyny w miejsce łańcucha lekkiego. W komórkach wielu typów poszukiwania tej podjednostki nie przyniosło wyniku. Sugeruje to, że kompleks pomiędzy podjednostką α_3 i receptorem transferyny jest specyficzny dla niektórych typów komórek nowotworowych i może stanowić cel terapii przeciwrakowej. Duże możliwości terapeutyczne wydają się stwarzać wyizolowane z jadu węży, wiążące sekwencję RGD, inhibitory integryn, dezintegryny [79]. Dodanie dezintegryn do inwazyjnych komórek glejaka zmniejsza ich adhezję oraz migrację [8].

Transfekcja transformowanych komórek jajnika chomika chińskiego integryną $\alpha_5\beta_1$ powoduje zmniejszenie tempa ich migracji, szybkości proliferacji i w znacznym stopniu redukuje ich złośliwość [80]. Podobny efekt przynosi transfekcja komórek raka sutka integryną $\alpha_2\beta_1$ [81]. Jednakże tworzenie przerzutów przez komórki ludzkiego raka sutka może być hamowane przez wprowadzenie przeciwciał skierowanych przeciwko receptorowi fibronektyny $\alpha_5\beta_1$, podczas gdy iniekcja do organizmu myszy spolimeryzowanej formy fibronektyny zapobiega powstawaniu przerzutów komórek czerniaka, mięsaka kości i raka jelita grubego [82]. Choć udział integryn w inwazyjności glejaków jest niewątpliwy [8], to złożona zależność procesu inwazji od funkcjonowania różnych integryn komplikuje ich zastosowanie zarówno jako markerów prognostycznych, jak i do celów terapii przeciwnowotworowej [83]. Obecnie brak jest spójnej zależności progresji nowotwo-

²Rola urokinazowego układu aktywacji plazminogenu w progresji nowotworów złośliwych została opisana w „Postęпах Biochemii” w numerze 45(1) z 1999 roku.

rów od ekspresji receptorów integrynowych — w wielu przypadkach zwiększonej inwazyjności komórek rakowych towarzyszy zmniejszenie ekspresji integryn, jednakże integryny są niezbędne dla nabycia przez komórki fenotypu metastatycznego. Migracja komórek zachodząca przy udziale integryn zależy od trzech czynników: gęstości liganda, poziomu ekspresji integryn oraz powinowactwa integryny do substratu [84]. Cechy substratu mogą się zmieniać w zależności od jego położenia, a ekspresja integryn i ich powinowactwo do ligandów mogą być modulowane przez występujące lokalnie cytokiny [85]. Zatem ekspresja integryn w chorobach nowotworowych może odgrywać duże znaczenie, nie obrazuje jednak ona funkcjonalnej aktywności tych molekuł, zależnej od wielu różnych czynników. Możliwe są sytuacje, w których pomimo wysokiej ekspresji receptora integrynowego w komórkach nowotworowych, poziom jego aktywności będzie niski; nie można również wykluczyć sytuacji odwrotnych. Stan taki obserwowano w komórkach raka sutka, które wykazywały wysoki stopień adhezji do witronektyny, w przeciwieństwie do komórek pochodzących z nowotworu łagodnego, przy czym komórki obu typów charakteryzowały się takim samym poziomem ekspresji receptorów witronektyny $\alpha_v\beta_1$ i $\alpha_v\beta_5$ [60, 86]. Ważnym wnioskiem płynącym z przytoczonych spostrzeżeń jest konieczność kompleksowej interpretacji otrzymanych wyników poziomu ekspresji integryn w raku. Wyniki badań immunocytochemicznych, w których stwierdzono ekspresję integryny $\alpha_2\beta_1$ w około 25% badanych komórek raka, jednakże bez żadnej korelacji pomiędzy występowaniem integryny a wielkością guza, stopniem zróżnicowania, aneuploidią i stanem okolicznych węzłów chłonnych nie pozwalają na wyciągnięcie jednoznacznej opinii na temat jej udziału w istnieniu tej patologii [87].

V. Ekspresja integryn jako cel antysensowej terapii przeciwinwazyjnej

V-1. Przeciwinwazyjne strategie antysensowe w chorobach nowotworowych

Zastosowanie antysensowych oligonukleotydów pozwala na hamowanie ekspresji genu w oparciu o znajomość jego cDNA⁵. Związki te są stosowane w terapii przeciwnowotworowej ze względu na ich specyficzne działanie hamujące ekspresję onkogenów

oraz innych genów mających znaczenie dla inicjacji i rozwoju transformacji nowotworowej. Obecnie w I fazie badań klinicznych znajdują się między innymi leki zawierające antysensowe oligonukleotydy hamujące ekspresję genów *H-ras* [88], *c-raf* [89], *bcl-2* [90] czy *p53* [91]. Antysensowe oligonukleotydy znajdują zastosowanie przede wszystkim w terapii raków krwi, w których komórki, na skutek pojedynczej zmiany genetycznej, przejawiają fenotyp złośliwy. W przypadku większości stałych raków nabłonkowych komórki przechodzą złożone zmiany w swym kariotypie i stają się mniej podatne na hamowanie funkcji pojedynczego zmutowanego genu, ponieważ o ich fenotypie decyduje więcej zmian genetycznych [92]. Ostatnio zidentyfikowano jednak szereg genów mających podstawowe znaczenie dla kontroli cyklu komórkowego, inicjacji apoptozy, przesyłania sygnałów, a więc procesów, które w przypadku zaburzeń mogą stanowić o nabyciu fenotypu złośliwego. Komórka o fenotypie inwazyjnym, to komórka zdolna do migracji i adhezji, ale w nietypowym miejscu i niewłaściwym czasie. Jak już wspomniano, procesy adhezji komórek (również nowotworowych) do ECM zachodzą poprzez oddziaływanie liganda znajdującego się w ECM z receptorem zlokalizowanym na powierzchni komórki. Zatem geny kodujące receptory integrynowe mogą być celem terapii genowej wymierzonej przeciw pojawieniu się i rozwojowi fenotypu inwazyjnego.

Zastosowanie strategii antysensowej z użyciem oligodeoksyrybonukleotydów nie poddanych żadnym modyfikacjom (niemodyfikowane oligodeoksyrybonukleotydy, ODN) napotyka na poważne trudności ze względu na aktywność egzonukleaz komórkowych. W celu uniknięcia degradacji oligonukleotydów oraz dążenia do poprawienia efektywności ich działania wprowadzono szereg modyfikacji ODN, dotyczących przede wszystkim szkieletu cukrowo-fosforanowego. Zastąpienie w szkielecie atomu tlenu przez siarkę powoduje powstanie fosfotiolowych analogów ODN (PS-ODN), odpornych na działanie 3' → 5' egzonukleaz, stabilnych w płynach ustrojowych i łatwo pobieranych przez komórki prawidłowe i nowotworowe zarówno *in vitro* jak i *in vivo* [93]. PS-ODN mogą specyficznie hybrydować z DNA i RNA. Po połączeniu PS-ODN z RNA następuje trawienie hybrydy przez RNazę H, prowadzące do zahamowania ekspresji genu w transkrypcji. Oligonukleotydy antysensowe mogą być z

⁵Strategiom antysensowym poświęcono w „*Postęпах Biochemii*” artykuły w numerach 39(4), 40(3), 44(2) i 44(4).

powodzeniem stosowane do hamowania ekspresji PAI-1 i uPAR, których podwyższony poziom, co zostało już podkreślone, towarzyszy wielu chorobom nowotworowym. W zespole jednego z autorów zsyntetyzowano i zastosowano do hamowania ekspresji PAI-1 oligonukleotydy oraz ich analogi, które były komplementarne do obszaru mRNA poprzedzającego kodon startu [94-96].

Morfologia komórek ludzkiego glejaka transfekowanych antysensowymi oligonukleotydami ulega zmianie, czego konsekwencją jest deformacja cytoszkieletu oraz zmniejszona inwazyjność [97, 98]. W komórkach tych obserwuje się również zwiększoną ekspresję integryny $\alpha_3\beta_1$, co sugeruje, że inwazyjność tych komórek wymaga skoordynowanej ekspresji uPAR i integryn. Komórki glejaka linii SNB19, charakteryzującego się wysokim stopniem inwazyjności, po transfekcji wektorem zdolnym do ekspresji antysensowego transkryptu komplementarnego do 300 zasad na końcu 5' genu *uPAR*, charakteryzowały się obniżonym poziomem uPAR oraz zmniejszoną inwazyjnością. Podobne wyniki uzyskano dla komórek ludzkiego mięsaka kości transfekowanego transkryptem mRNA komplementarnym do 1021 zasad na końcu 3' genu *uPA* [99].

V-2. Strategie antysensowe skierowane na ekspresję integryn

Udział receptorów integrynowych w patogenezie chorób, w których występuje zaburzenie regulacji adhezji i migracji komórek, określa je jako potencjalny cel terapeutyczny w tych chorobach. Dotychczas uzyskane wyniki wskazują, że inaktywacja integryn płytkowych, komórek śródbłonna lub mięśni gładkich może zapobiegać zakrzepicy lub restenozie, czyli nawrotowi zwężenia tętnic w miejscu wykonywania angioplastyki. Opracowano szereg niskocząsteczkowych inhibitorów receptorów integrynowych zawierających sekwencję RGD lub wykazujących strukturalne podobieństwo do polipeptydów RGD, które odwracalnie blokują oddziaływanie komórek z ECM. Inhibitory niskocząsteczkowe charakteryzują się jednak krótkim okresem półtrwania i dla polepszenia ich właściwości próbuje się stosować wymieniane już dezintegriny, peptydomimetykę oraz przeciwciała monoklonalne [77]. Opisano wiele syntetycznych związków, o budowie przestrzennej przypominającej strukturę polipeptydów RGD i KQAGD, które mają właściwości przeciwzakrzepowe. Działanie tych leków jest skierowane na blokowanie receptorów, które uległy już ekspresji. Taka terapia może prowadzić do trudnych do przeci-

wienia konsekwencji, bowiem związanie niskocząsteczkowego liganda z receptorem integrynowym może: (a) zmienić aktywność receptorową pozostałych integryn, doprowadzając do niepożądanego fenotypu komórkowego; (b) wywołać szereg zmian konformacyjnych w cząsteczce receptora, przekazywanych poprzez domeny cytoplazmatyczne do wnętrza komórki, gdzie przy udziale układu kinaz białkowych i białek Ras wytworzona zostaje seria sygnałów modyfikujących funkcje innych receptorów integrynowych. Procesy te mogą prowadzić do nieoczekiwanych efektów biologicznych [21], np. przeciwciała, które blokują $\alpha_v\beta_3$ mogą jednocześnie hamować fagocytozę zależną od $\alpha_5\beta_1$, zaś przyłączenie inhibitora przez $\alpha_4\beta_1$ znosi ekspresję metaloproteaz zależną od 51. Blokowanie $\alpha_{11b}\beta_3$ inhibitorami niskocząsteczkowymi, hamuje również adhezję do fibronektyny, odbywającą się za pośrednictwem $\alpha_5\beta_1$; z kolei peptydy z sekwencją domen wewnątrzkomórkowych podjednostek β hamują równolegle aktywację komórek [22], odtwarzanie macierzy oraz migrację komórek. Brak takich właściwości w wyizolowanych integrynach sugeruje, że domeny cytoplazmatyczne podjednostek biorą bezpośredni udział w hamowaniu funkcji receptorowej. W poszukiwaniu leków pozbawionych takich ograniczeń zastosowano antysensowe oligonukleotydy.

Ekspresja fibronektyny i jej receptora w fibroblastach podlega wspólnej regulacji, z kolei TGF- β indukuje zwiększenie zróżnicowania fenotypu w komórkach linii raka jelita grubego i zwiększa ekspresję fibronektyny i jej receptora. Zastosowanie antysensowych oligonukleotydów mRNA fibronektyny blokuje indukcję fibronektyny wywołaną przez TGF- β . W ten sposób TGF- β nie jest w stanie ani podwyższyć ekspresji $\alpha_5\beta_1$, ani zwiększyć adhezji komórek rakowych do fibronektyny zlokalizowanej w ECM [100].

Gen kodujący podjednostkę β_1 może ulegać alternatywnemu składaniu dając podjednostkę β_{1c} , zawierającą unikatową sekwencję 48 aminokwasów [101]. Wariant ten ulega ekspresji w komórkach nabłonka ludzkiego gruczołu krokowego razem z inhibitorem cyklu komórkowego p27(kip1). Utrata tego ostatniego koreluje z niekorzystną prognozą w raku prostaty. Hamujący wpływ β_{1c} na proliferację komórek może być całkowicie zniesiony przez zastosowanie antysensowych oligonukleotydów dla p27(kip1). Wskazuje to na specyficzny mechanizm hamowania procesu przez integryny i ukazuje rolę β_{1c} jako regulatora ekspresji p27, czyniąc tę podjednostkę potencjalną tarczą w antysensowej terapii raka prostaty.

VI. Uwagi końcowe

Migracja komórek w organizmach wielokomórkowych wymaga skoordynowanego i ukierunkowanego oddziaływania komórek między sobą i z ECM. Adhezja komórek do ECM zachodzi głównie przy udziale integrzyn. Zaburzenia procesów migracji i adhezji komórek, towarzyszące wielu stanom chorobowym, w tym nowotworom złośliwym, można wiązać z nieprawidłowym poziomem ekspresji integrzyn. Komórki nowotworowe są zdolne do ekspresji integrzyn, a ich poziom jest zazwyczaj różny od poziomu w komórkach prawidłowych, z których się wywodzą. Poziom ekspresji integrzyn w komórkach nowotworowych często można powiązać z ich fenotypem, w szczególności z cechami określającymi stopień inwazyjności i zdolności do tworzenia przerzutów. Stwarza to z jednej strony możliwość wykorzystania integrzyn jako markerów prognostycznych, z drugiej zaś wpływania na przebieg choroby nowotworowej poprzez regulowanie funkcji tych receptorów. Zróżnicowanie integrzyn i różnorodność wzajemnych powiązań między nimi sprawia, że w chwili obecnej nie można ustanowić ogólnej, jednoznacznej zależności pomiędzy charakterystyką integrzyn i klinicznymi wyznacznikami choroby nowotworowej. W dotychczas zbadanych przypadkach widoczny jest silny związek pomiędzy integrzynami i układem aktywacji plazminogenu, który odgrywa ważną rolę w progresji nowotworów. Stwarza to możliwość zarówno prognozowania przebiegu nowotworów, jak i postępowania terapeutycznego, zmierzającego do hamowania inwazyjności i zdolności do tworzenia przerzutów. Wzajemne powiązania pomiędzy integrzynami sprawiają, że terapia zmierzająca do hamowania progresji nowotworów, polegająca na zmianie właściwości pojedynczych integrzyn może przynosić nieprzewidywalne skutki. Dlatego też regulacja ekspresji na poziomie transkrypcji wybranych integrzyn wydaje się być bezpieczniejsza. Regulacja taka może być przeprowadzona przez zastosowanie antysensownych oligonukleotydów. Ponieważ dla inwazji i metastazy nowotworów, obok adhezji i migracji komórek rakowych, konieczne jest także działanie enzymów proteolitycznych, strategia antysensowna skierowana na integrzyny i składniki układu aktywacji plazminogenu może być skuteczną terapią ograniczającą progresję nowotworów złośliwych.

Artykuł otrzymano 28 czerwca 1999 r.

Zaakceptowano do druku 25 sierpnia 1999 r.

Piśmiennictwo

1. Hynes RO (1992) *Cell* **69**: 11-25
2. Friedl P, Brocker EB, Zanker KS (1998) *Cell Adhes Commun* **6**: 225-236
3. Capmany G, Mart M, Santalo J, Bolton VN (1998) *Mol Hum Reprod* **4**: 951-956
4. Zachary I (1997) *Int J Biochem Cell Biol* **29**: 929-934
5. Perks CM, Gill ZP, Newcomb PV, Holly JM (1999) *Br J Cancer* **79**: 701-706
6. Pollman MJ, Naumovski L, Gibbons GH (1999) *Circulation* **99**: 2019-2026
7. De la Fuente MT, Casanova B, Garcia-Gila M, Silva A, Garcia-Pardo A (1999) *Leukemia* **13**: 266-274
8. Hynes RO (1987) *Cell* **48**: 549-554
9. Cierniewski CS (1994) *Postępy Biochemii* **40**: 45-54
10. Goldbrunner RH, Bernstein JJ, Tonn JC (1998) *Microsc Res Tech* **42**: 250-257
11. Capmany G, Mart M, Santalo J, Bolton VN (1998) *Mol Hum Reprod* **4**: 951-956
12. Friedl P, Brocker EB, Zanker KS (1998) *Cell Adhes Commun* **6**: 225-236
13. Ruoslahti E, Pierschbacher MD (1987) *Science* **238**: 491-497
14. Ginsberg MH, Loftus JC, Plow EF (1988) *Thromb Haemost* **59**: 1-6
15. Elices MJ, Hemler ME (1989) *Proc Natl Acad Sci USA* **86**: 9906-9910
16. Guan JL (1997) *Int J Biochem Cell Biol* **29**: 1085-1096
17. Chi-Rosso G, Gotwala PJ, Yang J, Ling L, Jiang K, Chao B, Baker DP, Burkly LC, Fawell SE, Kotliansky VE (1997) *J Biol Chem* **272**: 31 447-31 452
18. Ruoslahti E, Noble NA, Kagami S, Border WA (1994) *Kidney Int* **45**: 17-22
19. Albeda SM (1993) *Lab Invest* **265**: 4-17
20. Leavesley DI, Ferguson G, Wayner E, Cheresh DA (1992) *J Cell Biol* **117**: 1101-1107
21. Wu C, Keightley SY, Leung-Hagesteijn C, Radeva G, Coppolino M, Goicoechea S, McDonald JA, Dedhar S (1998) *J Biol Chem* **273**: 528-536
22. Coppolino MG, Woodside MJ, Demaurex N, Grinstein S, St-Arnaud R, Dedhar S (1997) *Nature* **386**: 843-847
23. Shibayama H, Anzai N, Braun SE, Fukuda S, Mantel C, Broxmeyer HE (1999) *Blood* **93**: 1540-1548
24. Chen Q, Kinch NS, Lin TH, Burridge K, Juliano RL (1994) *J Biol Chem* **269**: 26602-26605
25. Shaller MD, Otey CA, Hildebrand JD, Parsons JT (1995) *J Cell Biol* **130**: 1181-1187
26. Parsons JT, Schaller MD, Hildebrand J, Tzhen-g-Horng L, Richardson A, Otey C (1994) *J Cell Sci* **19**: 109-113
27. Schlaepfer DD, Hanks SK, Hunter T, van der Geer P (1994) *Nature* **372**: 786-791
28. Law DA, Nannizzi-Alaimo L, Phillips DR (1996) *J Biol Chem* **271**: 10811-10815
29. Dorahy DJ, Berndt MC, Burns GF (1995) *Biochem J* **309**: 481-490
30. Clark EA, Brugge JS (1993) *Molec Cell Biol* **13**: 1863-1871
31. Fox JE, Lipfert L, Clark EA, Reynolds CC, Austin CD, Brugge JS (1993) *J Biol Chem* **268**: 25 973-25 984
32. Clark EA, Shattil SJ, Ginsberg MH, Bolen J, Brugge JS (1994) *J Biol Chem* **269**: 28859-28864
33. Lipfert L, Haimovich B, Schaller MD, Parsons JT, Brugge JS (1992) *J Cell Biol* **12**: 905-912
34. Dash D, Aepfelbacher M, Siess W (1995) *FEBS Lett* **363**: 231-234
35. Chan BMC, Kassner PD, Schiro JA, Byers HR, Kupper TS, Hemler MA (1992) *Cell* **68**: 1051-1060
36. Streuli CH, Bailey N, Bissell MJ (1991) *J Cell Biol* **115**: 1385-1395
37. Erickson CA (1987) *Dev Biol* **120**: 38-49

38. Faull RJ, Ginsberg MH (1995) *Stem Cells* **13**: 38-46
39. Block KL, Poncz M (1995) *Stem Cells* **13**: 135-145
40. Tang DG, Honn KV (1995) *Invasion Metastasis* **14**: 109-122
41. Honn KV, Chen YQ, Timar J, Onoda JM, Hatfield JS, Fligiel SE, Steinert BW, Diglio CA, Huang S, Chakrabarty S (1994) *Int J Cancer* **57**: 742-746
42. Tang DG, Onoda JM, Steinert BW, Grossi IM, Nelson KK (1993) *Int J Cancer* **54**: 338-347
43. Trikha M, Timar J, Lundy SK, Szekeres K, Cai Y, Porter AT, Honn KV (1997) *Cancer Rev* **57**: 2522-2528
44. Calvete JJ (1994) *Thromb Haemost* **72**: 1-15
45. Shattil SJ, Ginsberg MH, Brugge JS (1994) *Curr Opin Cell Biol* **6**: 695-704
46. Trikha M, Timar J, Lundy SK, Szekeres K, Tang K, Grignon D, Porter AT, Honn KV (1996) *Cancer Res* **56**: 5071-5078
47. Oleksowicz L, Morawiec Z, Schwartz E, Khors-hidi M, Dutcher JP, Puzkin E (1995) *Thromb Res* **79**: 261-274
48. Chiang HS, Peng HC, Huang TF (1994) *Biochim Biophys Acta* **1224**: 506-515
49. Leavesley DI, Schwartz MA, Rosenfeld M, Cheresh DA (1993) *J Cell Biol* **121**: 163-170
50. Bach TL, Barsigian C, Chalupowicz DG, Busler D, Yaen CH, Grant DS, Martinez J (1998) *Exp Cell Res* **238**: 324-334
51. Senger DR, Clafey KP, Benes JP, Perruzzi CA, Sergiou AP, Detmar M (1997) *Proc Natl Acad Sci USA* **94**: 13612-13617
52. Eliceiri BP, Klemke R, Stromblad S, Cheresh DA (1998) *J Cell Biol* **140**: 1255-1263
53. Stromblad S, Becker JC, Yebra M, Brooks PC, Cheresh DA (1996) *J Clin Invest* **98**: 426-433
54. Harper JW, Adami GR, Wei N, Keyomarsi K, Elledge SJ (1993) *Cell* **75**: 805-816
55. Boudreau N, Werb Z, Bissell MJ (1996) *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 3509-3513
56. Brooks PC, Stromblad S, Sanders LC, von Schalscha TL, Aimes RT, Stetler-Stevenson WG, Quigley JP, Cheresh DA (1996) *Cell* **85**: 683-693
57. Brooks PC, Silletti S, von Schalscha TL, Friedlander M, Cheresh DA (1998) *Cell* **92**: 391-400
58. Damiano JS, Cress AE, Hazlehurst LA, Shtil AA, Dalton WS (1999) *Blood* **93**: 1658-1667
59. Bates RC, Elith CA, Thorne RF, Burns GF (1998) *Cell Adhes Commun* **6**: 21-38
60. Matter ML, Zhang Z, Nordstedt C, Ruoslahti E (1998) *J Cell Biol* **141**: 1019-1030
61. Buckley CD, Pilling D, Henriquez NV, Parsonage G, Threlfall K, Scheel-Toellner D, Simmons DL, Akbar AN, Lord JM, Salmon M (1999) *Nature* **397**: 534-549
62. Meyer T, Hart IR (1998) *Eur J Cancer* **34**: 214-221
63. Ohnishi T, Arita N, Hiraga S, Taki T, Izumoto S, Fukushima Y, Hayakawa T (1997) *Clin Exp Metastasis* **15**: 538-546
64. Lang SH, Clarke NW, George NJ, Testa NG (1997) *Clin Exp Metastasis* **15**: 218-227
65. Mitjans F, Sander D, Adan J (1995) *J Cell Sci* **108**: 2825-2838
66. Gladson CL (1996) *J Neuropathol Exp Neurol* **55**: 1143-1149
67. Dedhar S, Saulnier R (1990) *J Cell Biol* **110**: 481-489
68. Cioce V, Castronovo V, Shmookler BM, Garbisa S, Grigioni WF, Liotta LA, Sobel M (1991) *J Natl Cancer Inst* **83**: 29-36
69. Ruiz P, Dunon D, Sonnenberg A, Imhof BA (1993) *Cell Adhesion Commun* **1**: 67-81
70. Natali PG, Nicotra MR, Botti C, Mottolise M, Bigotti A, Segatto O (1992) *Br J Cancer* **66**: 318-322
71. Blasiak J, Smolarz B, Piestrzeniewicz D (1999) *Postępy Biochemii* **45**: 42-50
72. Vogelmann R, Kreuser ED, Adler G, Lutz MP (1999) *Int J Cancer* **80**: 791-795
73. Andreasen PA, Kjoller L, Christensen L, Duffy MJ (1997) *Int J Cancer* **72**: 1-22
74. Kjoller L, Kanse SM, Kirkegaard T, Rodenburg KW, Ronne E, Goodman SL, Preissner KT, Ossowski L, Andreasen PA (1997) *Exp Cell Res* **232**: 420-429
75. Xue W, Hashimoto K, Toi Y (1998) *J Cutan Pathol* **25**: 469-74
76. Hieken TJ, Ronan SG, Farolan M, Shilkaitis AL, Das Gupta TK (1999) *Cancer* **85**: 375-382
77. Nip J, Rabbani SA, Shibata HR, Brodt P (1995) *J Clin Invest* **95**: 2096-2103
78. Santos CLS, Giorgi RR, Frochtengarten F, Elias MCQB, Chammas R, Brentani RR (1994) *Int J Clin Lab Res* **24**: 148-153
79. Lundstrom A, Holmbom J, Lindqvist C, Nordstorm T (1998) *Biochim Biophys Res Commun* **250**: 735-740
80. Coppolino M, Migliorini M, Argraves WS, Dedhar S (1995) *Biochem J* **306**: 129-134
81. Gould RJ, Polokoff MA, Friedman PA, Huang TF, Holt JC, Cook JJ, Niewiarowski S (1990) *Proc Soc Exp Biol Med* **195**: 168-171
82. Giancotti FG, Ruoslahti E (1990) *Cell* **60**: 849-859
83. Zutter MM, Santoro SA, Staatz WD, Tsung YL (1995) *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 7411-7
84. Pasqualini R, Bourdoulous S, Koivunen E, Woods V, Ruoslahti E (1996) *Nature Medicine* **2**: 1197-1203
85. Tonn JC, Wunderlich S, Kerkau S, Klein CE, Rosen K (1998) *Anticancer Res* **18**: 2599-2605
86. Palecek SP, Loftus JC, Ginsberg MH, Lauffenburger DA, Horwitz AF (1997) *Nature* **385**: 537-540
87. Kim LT, Yamada KM (1997) *Proc Soc Exp Biol Med* **214**: 123-131
88. Maemura M, Akiyama SK, Woods VL, Dickson RB (1995) *Clin Exp Metastasis* **13**: 223-235
89. Charpin C, Garcia S, Bergeret D, Andrac L, Horchowski N, Choux R, Lavaut MN (1998) *Br J Cancer* **77**: 2274-2280
90. Chen G, Oh S, Monia BP, Stacey DW (1996) *J Biol Chem* **271**: 28 259-28 265
91. Monia BP (1997) *Ciba Found Symp* **209**: 107-119
92. Webb A, Cunningham D, Cotter F, Clarke PA, di Stefano F, Ross P, Corbo M, Dziewanowska Z (1997) *Lancet* **349**: 1137-1141
93. Bishop MR, Jackson JD, Tarantolo SR, O'Kane-Murphy B, Inversen PL, Bayever E, Joshi SM, Sharp JG, Pierson JL, Warkentin PI, Armitage JO, Kessinger A (1997) *J Hematother* **6**: 441-446
94. Le Beau MM (1997) W: DeVita JVT, Hellman S, Rosenberg SA (red) *Cancer: Principles and Practice of Oncology*. Lippincott-Raven, Philadelphia, str. 103
95. Boral AL, Dessain S, Chabner BA (1998) *Cancer Chemother Pharmacol* **42**: S3-S21
96. Cierniewski CS, Babińska A, Świątkowska M, Wilczyńska M, Okruszek A, Stec W (1995) *Eur J Biochem* **227**: 494-499
97. Wyroba E, Pawłowska Z, Kobylańska A, Pluskota E, Maszewska M, Stec WJ, Cierniewski CS (1996) *Biol Cell* **87**: 37-43
98. Stec WJ, Cierniewski CS, Okruszek A, Kobylańska A, Pawłowska Z, Koziolkiewicz M, Pluskota E, Maciaszek A, Rębowska B, Stasiak M (1997) *Antisense Nucleic Acid Drug Develop* **7**: 567-573
99. Quattrone A, Fibbi G, Anichini E, Pucci M, Zamperini A, Capaccioli S, Del Rosso M (1995) *Cancer Res* **55**: 90-95
100. Chintala SK, Mohanam S, Go Y, Venkaiah B, Sawaya R, Gokaslan ZL, Rao JS (1997) *Mol Carcinog* **20**: 355-365
101. Haeckel C, Krueger S, Roessner A (1998) *Int J Cancer* **77**: 153-160

Antygen CD44: czy występowanie jego izoform może mieć znaczenie w diagnostyce nowotworów jelita grubego?

Antigen CD44: does the presence of its isoforms have significance in colorectal cancer diagnostics?

PIOTR SZYMCZYK¹, ZOFIA M. KILIAŃSKA²

Spis treści

- I. Wstęp
- II. Struktura molekularna CD44
- III. Regulacja procesu składania mRNA antygeny CD44
- IV. Interakcje CD44 z kwasem hialuronowym
 - IV-1. Udział domeny zewnątrzkomórkowej w interakcjach z kwasem hialuronowym
 - IV-1.1. Regulacja procesu oligomeryzacji CD44
 - IV-1.2. Glikozylacja CD44 i modyfikacje przez glikozaminoglikany
 - IV-2. Udział domeny cytoplazmatycznej i transmembranowej w interakcjach z kwasem hialuronowym
- V. Ekspresja izoform CD44 w nowotworach jelita grubego
- VI. Znaczenie detekcji izoform CD44 w diagnostyce onkologicznej
- VII. Uwagi końcowe

Wykaz stosowanych skrótów: CD — kompleks różnicujący (ang. *Cluster of Differentiation*); ELISA — (ang. *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*), ERK — (ang. *Extracellular Signal Regulated Kinase*), GAG — glikozoaminoglikan; HA — kwas hialuronowy, nt — nukleotyd

I. Wstęp

Proteoglikany stanowią niejednorodną grupę glikoprotein. Związki te występują zarówno wewnątrzkomórkowo, jak i w przestrzeni pozakomórkowej. Ich cząsteczki buduje rdzeń polipeptydowy z którym poprzez wiązania *O*- lub *N*-glikozydowe łączą się oligosacharydy oraz zmienna liczba łańcuchów glikozoaminoglikanów (GAG). Budowę i funkcje dobrze dotychczas scharakteryzowanych proteoglikanów

Contents

- I. Introduction
- II. Molecular structure of CD44
- III. Regulation of CD44 mRNA splicing
- IV. Interactions of CD44 with hyaluronic acid
 - IV-1. Role of extracellular domain in interactions with hyaluronic acid
 - IV-1.1. Regulation of CD44 oligomerization
 - IV-1.2. CD44 glycosylation and modification with glycosaminoglycans
 - IV-2. Role of CD44 cytoplasmic and transmembrane domains in interactions with hyaluronic acid
- V. Expression of CD44 isoforms in colorectal cancers
- VI. Significance of CD44 detection in oncological diagnostics
- VII. Concluding remarks

przedstawiono wyczerpująco na łamach „*Postępyw Biochemii*” [1-3].

Jednym z transmembranowych proteoglikanów jest antygen CD44 kompleksu różnicującego leukocytów (ang. *Cluster of Differentiation*) wykryty w 1982 roku [4]. W literaturze ten proteoglikan jest opisywany jako *homing* receptor limfocytów (gp90), glikoproteina fagocyтуjąca 1 (pgp-1; phagocytic glycoprotein 1), receptor III macierzy zewnątrzkomórkowej (ang. *Extracellular Matrix Receptor III*) czy receptor kwasu hialuronowego (HA) (ang. *Hyaluronan Cell Adhesion Molecule, H-CAM*) [5-9]. Różnorodność w nazewnictwie antygeny CD44 (opisywanego również jako białko CD44) wynika z faktu, że pełni on szereg funkcji m.in. warunkuje umiejscowienie limfocytów w strukturach limfoidalnych, bierze udział w aktywacji leukocytów, w reakcjach zapalnych, przyłącza się do kolagenu, lamininy, fibronektyny i soli kwasu hialuronowego, umożliwiając kontakt komórka-macierz zewnątrzkomórkowa, pośredniczy w adhezji międzykomórkowej, uczestni-

¹Dr., ²prof. dr hab., Instytut Biochemii, Katedra Cytochemii UŁ, Zakład Biochemii Medycznej, ul. Banacha 12/16, 90-237 Łódź

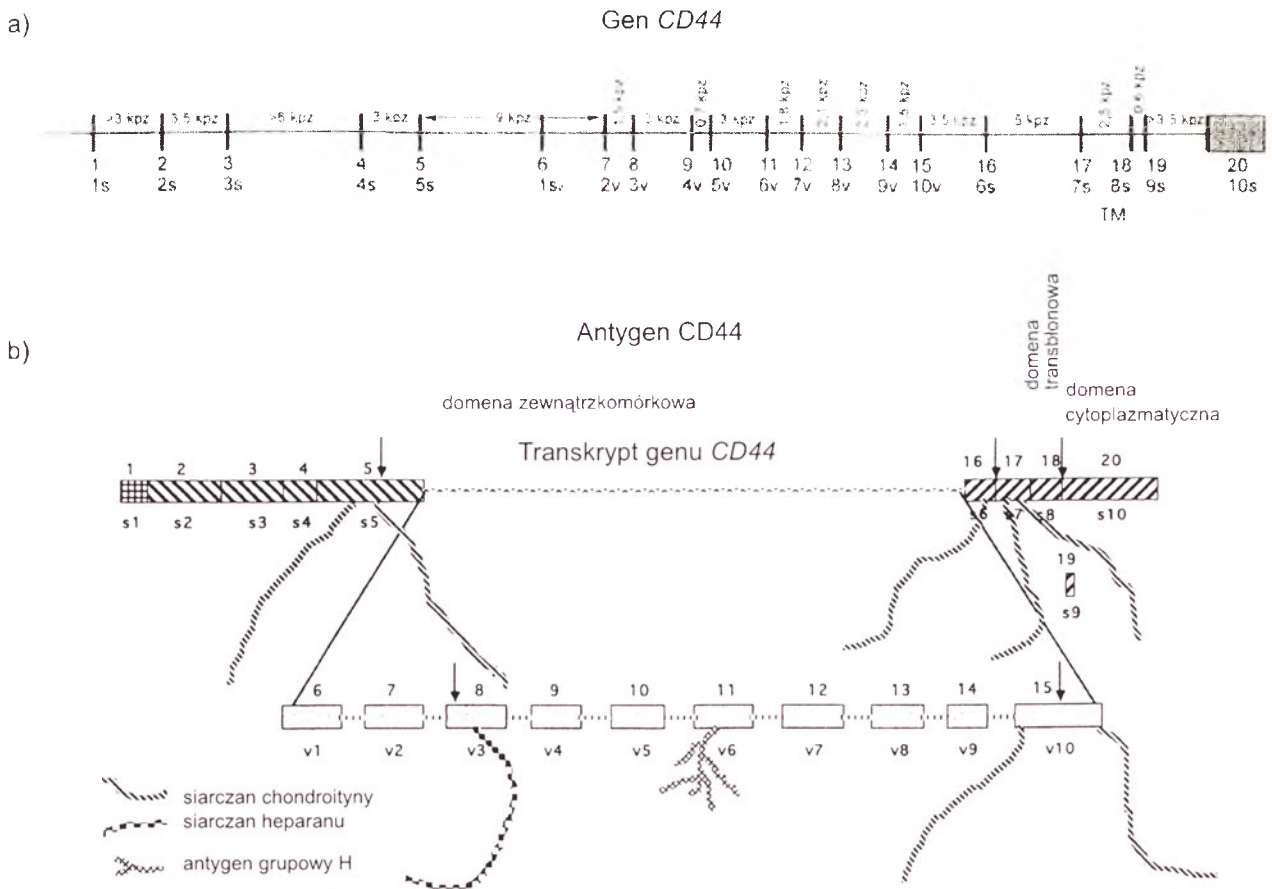
czy w morfogenezie oraz w powstawaniu przerzutów nowotworowych [10-17].

II. Struktura molekularna CD44

Gen *CD44*, którego strukturę opisano w 1982 roku jest zbudowany z około 50-60 kpz i zawiera 20 eksonów [18]. U człowieka jest usytuowany na ramieniu krótszym chromosomu 11.(11p13), zaś jego odpowiednik u myszy — na chromosomie 2. [18, 19]. Według ogólnie akceptowanego schematu struktury genu kodującego antygen CD44, zaproponowanego m.in. przez laboratorium Ursuli Günther [5, 6, 10] zawiera on 10 eksonów standardowych (ang. *standard*; s) oraz 10 eksonów zmiennych (ang. *variable*; v). Eksony standardowe tego genu zawierają informację dla syntezy tzw. standardowej izoformy antygeny — CD44s, opisywanej również symbolem CD44H (ang. *hematopoietic*). Izofорма ta występuje w większości komórek prawidłowych; jest główną

izoformą w limfocytach i komórkach hemopoetycznych. Stanowi podstawowy receptor kwasu hialuronowego. Rycina 1 stanowi kompilację danych dotyczących struktury genu *CD44* oraz produktu jego ekspresji — antygeny CD44, z uwzględnieniem możliwości jego modyfikacji. W genie *CD44* eksony standardowe zajmują pozycje 1-5 i 16-20, natomiast eksony zmienne — 6-15. Zapis ten może przyjąć również inną formę, tj. s1-s5, v1-v10, s6-s10 uwzględniając pozycje eksonów standardowych i zmiennych (por. Ryc. 1a,b). W sposobie zaproponowanym przez Borlanda i wsp. [20] eksony *CD44* są oznakowane numerami od 1. do 19., zaś pomiędzy eksonami 5. i 6. znajduje się ekson opisywany jako 6a.

Podczas ekspresji genu kodującego antygen CD44 może dochodzić do zjawiska alternatywnego składania jego transkryptu (ang. *alternative splicing*), związanego z odmiennym złożeniem głównie eksonów zmiennych. To właśnie alternatywne składanie mRNA *CD44* stanowi o ekspresji przez ten pojedyn-



Ryc. 1. Schemat organizacji struktury genu *CD44* (a), transkryptu *CD44* i produktu jego ekspresji (b) (kompilacja danych literaturowych [5, 23, 25]).

(a) gen *CD44* z zaznaczeniem eksonów standardowych (s) i zmiennych (v) oraz długości intronów (kpz);

(b) transkrypt genu *CD44*, w którym uwzględniono możliwość alternatywnego składania. Eksony standardowe s1-s10 (1-5, 16-20) zaznaczone prostokątami wypełnionymi odpowiednio, krótką (peptyd sygnałowy) i ukośnymi liniami kodują standardową izoformę CD44s. Prostokąty zaznaczone szarym kolorem reprezentują eksony zmienne (v1-v10: 6-15), które w różnych kombinacjach w toku alternatywnego składania mRNA dostarczają informacji dla biosyntezy izoform CD44v. Dodatkowe miejsca składania zaznaczono strzałkami. Na rycinie zaznaczono schematycznie domeny zewnątrzkomórkową, transmembranową i cytoplazmatyczną antygeny CD44 oraz możliwe miejsca przyłączenia siarczanu chondroityny, siarczanu heparanu oraz antygeny grupowego H ze wskazaniem eksonów, które kodują odpowiednie regiony antygeny CD44 wiążące te ligandy.

czy gen wielu polipeptydów o różnej masie cząsteczkowej. Ich modyfikacje przez glikozylację prowadzą do powstania wielu glikoprotein tzw. rodziny CD44.

W strukturze antygeny CD44 wyróżnia się trzy domeny (por. Ryc. 1b), tj. zewnątrzkomórkową, transmembranową i cytoplazmatyczną. Eksony standardowe s1.-s7. kodują domenę zewnątrzkomórkową o długości 248 aminokwasów, a ekson s8. — domenę transmembranową (21 aminokwasów). Eksony s9. i s10. mogą być odmiennie wykorzystane podczas składania transkryptu CD44 co prowadzi do utworzenia krótkiej (3 aminokwasów) lub dłuższej (70 aminokwasów) domeny cytoplazmatycznej antygeny CD44 [21]. Zsyntetyzowany na eksonach standardowych polipeptyd rdzeniowy, opisywany jako CD44s wykazuje masę cząsteczkową około 40 kDa [6, 10, 22]. Natomiast jego masa cząsteczkowa określana przez SDS-PAGE wynosi 80-95 kDa [21]. Okazało się że za te różnice masy cząsteczkowej CD44s odpowiada intensywna *N*- i *O*-glikozylacja jego domeny zewnątrzkomórkowej [21]. Miejsca *N*-glikozylacji są głównie zlokalizowane w segmencie domeny zewnątrzkomórkowej polipeptydu bardziej oddalonym od domeny transmembranowej zaś *O*-glikozylacji — bliżej tej domeny [21]. W regionie

położonym blisko domeny transmembranowej stwierdzono zespoły sekwencji wiążące siarczan chondroityny (por. Ryc. 2). Jak dotąd stosunkowo niewiele wiadomo o strukturze oligosacharydów wiążących się z rdzeniem białkowym CD44, a wydaje się, że ta modyfikacja warunkuje w znacznym stopniu jego funkcje [20].

Badania genetyczne ujawniły, że zarówno 10 eksonów zmiennych, jak i otaczające je eksony standardowe s5. i s6., a także eksony s9. i s10. (kodujące domenę cytoplazmatyczną) mogą łączyć się w różnych kombinacjach, zwiększając możliwość występowania wielu izoform białek rodziny CD44. Uwzględniając dwa kryptyczne miejsca składania w eksonach v3. i v10. teoretyczna liczba możliwych kombinacji transkryptów genu *CD44* przekracza 1000 [23]. Dotychczas w komórkach ludzkich opisano jedynie 30 naturalnie występujących izoform CD44 [5]. W wyniku alternatywnego składania pierwotnego transkryptu CD44 z udziałem eksonów zmiennych może dojść do utworzenia mRNA CD44, na matrycy którego domena zewnątrzkomórkowa może zostać wydłużona nawet o 420 reszt aminokwasowych [6]. Włączenie odcinków peptydowych czy polipeptydowych, kodowanych przez jeden lub więcej eksonów



Ryc. 2. Model struktury izoform CD44s i CD44v (na podstawie [23]).

a) Izoforma CD44s z możliwymi miejscami *N*-glikozylacji (regiony zaznaczone kropkami), *O*-glikozylacji (struktury „drzewek”) i przyłączenia łańcuchów siarczany chondroityny (cienkie boczne linie). Na rycinie zaznaczono prostokątem (wypełnionym ukośnymi liniami) — błonę komórkową, trójkątem — miejsce „wstawiania” regionów białkowych kodowanych przez eksony zmienne i dodatkową linią — regiony wiązania kwasu hialuronowego w N-końcu cząsteczki. b) Izoforma CD44v. Region wstawiony między trójkątami stanowi produkt ekspresji eksonów zmiennych v2-v10. Dodatkowe miejsca potranslacyjnej modyfikacji, zaznaczone w tym regionie CD44v, prowadzą do powstania obszarów o zwiększonej hydrofilowości (linia przerywana). Pozostałe oznakowania jak w „a”.

zmiennych, odbywa się między 202. a 203. resztą aminokwasową domeny zewnątrzkomórkowej izoformy CD44s [20, 24-27]. Określenie sekwencji cDNA kilku gatunków wykazało wysoki stopień homologii kodowanych przez nie polipeptydów. Jednakże najwięcej informacji zgromadzono dotychczas o izoformach CD44 człowieka, szczura i myszy. Białka rodziny CD44 tych gatunków cechuje wysoka homologia sekwencji [10, 23]. Wyniki badań genetycznych wykazały, że w komórkach ludzkich ekspresji nie ulega ekson v1 genu *CD44*, choć znane są izoformy tego białko zawierające produkt wspomnianego eksonu w komórkach myszy i szczura [10]. Regiony białek rodziny CD44, kodowane z udziałem eksonów zmiennych (tzw. izoformy CD44v) mogą ulegać dalszej glikozylacji (głównie O-glikozylacji), a także przyłączeniu łańcuchów siarczanu chondroityny, siarczanu heparanu bądź antygeny grupowego H [5, 23]. Analizy genetyczne wykazały, że siarczan chondroityny przyłącza się do odcinka białka kodowanego przez ekson v10., siarczan heparanu — ekson v3. natomiast antygen grupowy H — przez ekson v6. (por. Ryc. 1b). Niektóre izoformy antygeny CD44 o znacznym stopniu glikozylacji osiągają masę cząsteczkową 180-220 kDa [5, 11, 28, 29]. Izoformy CD44 zawierające produkty ekspresji eksonów zmiennych wykrywa się głównie w komórkach aktywnie proliferujących nabłonków, w zaktywowanych limfocytach i w komórkach nowotworowych [10, 30-37]. Jedną z izoform opisywaną jako CD44E (ang. *epithelial*) lub CD44v8-v10, dłuższa o 135 aminokwasów od CD44s, osiąga m.cz. 130-160 kDa i jest syntetyzowana w niewielkiej ilości w prawidłowych komórkach nabłonkowych, a w przypadku ich transformacji nowotworowej ulega nadekspresji [6, 17].

Wysokocząsteczkowe izoformy proteoglikanu CD44, zawierające sekwencje kodowane przez inne eksony zmienne występujące w zaktywowanych limfocytach to: CD44v6; CD44v9 i CD44v6-v10; natomiast w komórkach zmienionych nowotworowo — CD44v3; CD44v6; CD44v4-7; CD44v8-10 i CD44v10 [10, 24-31].

III. Regulacja procesu składania mRNA antygeny CD44

Dotychczasowe badania wskazują, że synteza określonej cząsteczki rodziny CD44 jest kontrolowana przez białka regulatorowe (czynniki *trans*), specyficzne dla gatunku bądź typu komórek [38]. Zastosowanie heterokarionów utworzonych w drodze fuzji komórek prawidłowych i nowotworowych lub fu-

zji komórek zwierząt różnych gatunków pozwoliło wykazać, że kontrolę nad przebiegiem składania pre-mRNA CD44 przejmują czynniki *trans* wywodzące się z jednej z dwu komórek poddawanych fuzji. Dochodzi wówczas do zahamowania syntezy mRNA oraz białka CD44 charakterystycznego dla drugiego typu komórek, użytych do fuzji. Wyniki te zostały potwierdzone przez badania immunohistochemiczne z zastosowaniem specyficznych przeciwciał monoklonalnych oraz technikę RT-PCR. Prawdopodobnie czynnik/i *trans* kierują procesem włączania kolejnych eksonów w kierunku 3'(10v)→5'(1v), zaś wydajność tego procesu ulega stopniowemu zmniejszeniu.

Występowanie wielu różnorodnych izoform CD44 można wytłumaczyć działaniem czynników *trans*, które regulują składanie określonych eksonów. Przy pomocy wzorcowego układu eksonu v5, otoczonego przez odcinki intronowe, udało się zidentyfikować sekwencje *cis* związane z negatywną (ang. *silencer*) i pozytywną (ang. *enhancer*) regulacją składania tego eksonu [39]. Domena wzmagająca składanie eksonu v5 jest zbudowana z dwóch fragmentów o długości około 40 nt. Jeden z nich powoduje indukcję składania eksonu v5 w linii mysiego chłoniaka LB17 2.3. Proces ten nasila się po zastosowaniu estrów forbolu lub transfekcji onkogenem Ha-ras. Delecja drugiego fragmentu tej domeny nie wpływa na wydajność procesu składania eksonu v5, co wskazuje, że uczestniczy on w utrzymywaniu niskiego, podstawowego poziomu syntezy mRNA. Zaobserwowano ponadto, że do osiągnięcia maksymalnej stymulacji procesu składania v5 przez estry forbolu nieodzowna jest kooperacja między fragmentami o naturze wzmacniaczy i represorów. Prawdopodobnie aktywacja szlaków sygnałowych prowadzi do zmian poziomu fosforylacji białek związanych z procesem składania oraz ich powinowactwa do pre-mRNA. Ostatnio zasugerowano, że proces stopniowego zmniejszania się wydajności włączania kolejnych eksonów do mRNA białka CD44, może być hamowany w wyniku skracania intronów [40].

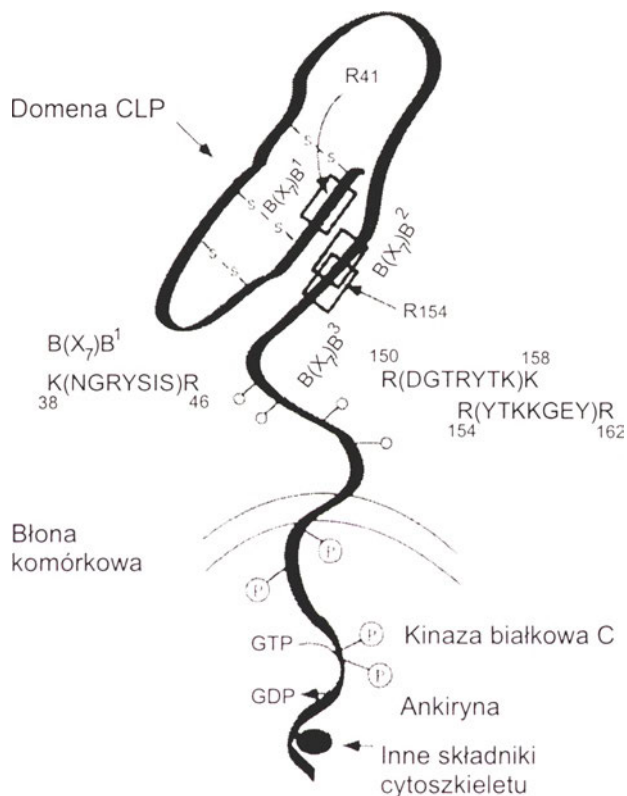
IV. Interakcje CD44 z kwasem hialuronowym

Ostatnio zaproponowano rozszerzenie rodziny białek wiążących kwas hialuronowy, tzw. hialoadheryn o grupę glikoprotein CD44 [9]. Cechą charakterystyczną hialoadheryn jest obecność zespołu sekwencji o homologii z domeną B białka wiążącego chrząstkę (ang. *Cartilage Link Protein*; CLP). Region odpowiedzialny za wiązanie HA znajduje się w N-końcowej, konserwatywnej ewolucyjnie części

cząsteczki białka rdzeniowego CD44, w domenie zewnątrzkomórkowej [9, 29, 41-45]. Kwas hialuronowy występujący w macierzy zewnątrzkomórkowej jest biologicznie ważnym ligandem białek rodziny CD44 [9, 29, 41-43]. Wzrost aktywności syntazy hialuronianowej oraz zwiększenie ilości HA zaobserwowano w wielu nowotworach [46-48]. Badania wykorzystujące metodę immunofluorescencyjną i cytometrię przepływową w obecności przeciwciał monoklonalnych hamujących wiązanie HA z CD44 umożliwiły określenie w cząsteczce antygeny CD44 co najmniej trzech motywów sekwencyjnych, uczestniczących w wiązaniu tego ligandu [48, 49]. Wspomniane motywy stanowią tzw. sekwencję zgodności białek wiążących HA, opisywaną jako B(X₇)B. Motyw taki stanowi 9-aminokwasowy odcinek, w którym skrajne reszty są aminokwasami zasadowymi (B), otaczającymi 7 dowolnych aminokwasów, wśród których znajduje się przynajmniej jeden aminokwas zasadowy. Motywy wiążące HA zlokalizowano między: 38.-46., 150.-158. i 154.-162. resztą aminokwasową domeny zewnątrzkomórkowej CD44 (Ryc. 3). Szczególną funkcję w oddziaływaniach z HA odgrywa arginina w pozycji 154., usytuowana w obrębie dwóch nakładających się motywów B(X₇)B regionu centralnego wspomnianej domeny CD44. Istotną rolę argininy w pozycji 154. w interakcjach z HA potwierdziły efekty fenotypowe mutacji prowadzące do podstawienia jej przez histydynę. Dzięki zastosowaniu metod inżynierii genetycznej udało się poznać oddziaływania regionu N-końcowego i centralnego (między 38. a 162. aminokwasem) cząsteczki CD44 z HA [41, 42]. Analiza wiązania z HA fragmentów cząsteczki CD44 zawierających jedynie: 131, 145, 186 i 210 N-końcowych aminokwasów wykazała ich asocjację z HA immobilizowanym na ściankach kuwet licznika scyntylacyjnego [49]. Okazało się jednak, że dwa krótsze fragmenty cząsteczki CD44 cechowało niższe powinowactwo do HA. Na tej podstawie można wnioskować, że do efektywnego wiązania ligandu wymagany jest N-końcowy i centralny segment domeny zewnątrzkomórkowej CD44, który ulega zwinięciu, zapewniając zbliżenie motywów B(X₇)B z udziałem reszt argininy w pozycji 41. i 154. (Ryc. 3). Podstawienie aminokwasów zasadowych przez alaninę lub glicynę w obrębie motywu B(X₇)B zmniejsza powinowactwo do HA. Podobny efekt wywołują podstawienia aminokwasowe poza tą sekwencją, które wpływają na drugorzędową strukturę domeny CLP [50, 51]. Prawdopodobnie, zależności te są bardziej złożone. Opisano bowiem dwa podstawienia aminokwasów w

motywie wiążącym HA, które nie wpływają na powinowactwo CD44 do tego ligandu [49, 52].

Otrzymane przez van der Voorta i wsp. [51] wyniki przemawiają za występowaniem pewnej komórkowej specyficzności procesu asocjacji CD44s lub CD44v z HA. Transfekcja komórek chłoniaika Namalwa i małych fibroblastów linii COS za pomocą cDNA kodującego CD44s, CD44v3-v10 i CD44v8-v10 ujawniła, że wszystkie wymienione izoformy w zbliżonym stopniu wiążą HA w komór-



Ryc. 3. Schematyczne przedstawienie miejsc wiązania kwasu hialuronowego w cząsteczce CD44 (na podstawie [48]). Na rycinie zaznaczono: trzy motywy B(X₇)B wiązania HA w zewnątrzkomórkowej domenie CD44 w postaci prostokątów, domenę CLP, która przez trzy mostki disiarczkowe tworzy pętlę w N-końcu cząsteczki CD44, miejsca wiązania siarczanu chondroitynu (o) oraz prawdopodobne miejsca fosforylacji reszt seryny domeny cytoplazmatycznej przez kinazę białkową C (P). Motywy B(X₇)B¹, B(X₇)B² i B(X₇)B³ przedstawiono za pomocą jednoliterowych symboli reszt aminokwasowych.

kach COS, natomiast w komórkach Namalwa ligand ten asocjuje tylko z CD44s. To sugeruje, że modyfikacje izoform CD44, zawierających produkty ekspresji eksonów zmiennych mogą być zaangażowane w regulację wiązania HA.

IV-1. Rola domeny zewnątrzkomórkowej CD44 w interakcjach z kwasem hialuronowym

IV-1.1. Regulacja procesu oligomeryzacji CD44

Badania prowadzone w wielu laboratoriach wskazują, że występowanie określonych izoform typu CD44s lub CD44v nie determinuje ich powinowactwa do HA [53-57]. Przyjmuje się, że określona konformacja regionu zewnątrzkomórkowego cząsteczki CD44 stanowi o stopniu jej powinowactwa do HA. Region ten może dodatkowo podlegać zmianom przez modyfikacje potranslacyjne białka, głównie przez *N*- i *O*-glikozylację oraz przyłączenie niektórych glikozoaminoglikanów (GAG) [58]. Okazało się, że znacznie wyższe powinowactwo do HA wykazują cząsteczki CD44 w formie dimerów lub oligomerów CD44 niż jako monomery [54, 59]. Wiązanie tego ligandu przez CD44 w limfocytach może być indukowane przez przeciwciała monoklonalne IRAWB14 lub IRAWB26 (mysz) bądź F.10.44.2 (człowiek). Prawdopodobnie mechanizm tego procesu polega na asocjacji antygeny CD44 lub/i zmianach konformacyjnych jego domeny zewnątrzkomórkowej. Wiązanie HA przez komórki zachodzi w obecności przeciwciał monoklonalnych Ig2a lub oligomerów fragmentów Fab [59]. Obie postacie przeciwciał agregują cząsteczki CD44 w większe zespoły. Monomery CD44 nie tworzą takich agregatów co wyraża się około 20-50-krotnie niższym wiązaniem znakowanego fluorescencyjnie HA. Z kolei po transfekcji komórek raka trzustki AS plazmidem, zawierającym informację dla syntezy izoformy CD44v4-v7 obserwowano, że powinowactwo zsyntetyzowanego polipeptydu do HA jest nawet około 10-krotnie wyższe w przypadku gdy powstają jego dimery (280 kDa) lub oligomery (350 kDa). Należy zaznaczyć, że w procesie oligomeryzacji z udziałem CD44v4-v7 nie uczestniczą obecne na powierzchni komórek cząsteczki izoformy białka CD44s. Formowanie agregatów CD44v4-v7 wymaga powstawania wiązań disiarczkowych, a obecność substancji redukujących (ditiotretitol) blokuje przebieg oligomeryzacji. Powstawanie oligomerów CD44v4-v7 jest ponadto hamowane przez inhibitory *N*-glikozylacji np. tunikamycynę, która blokuje jednocześnie wiązanie HA przez transfekowane komórki AS [59].

IV-1.2. Glikozylacja CD44 oraz modyfikacje przez glikozoaminoglikany

Proces glikozylacji CD44 jest komórkowo specyficzny [60]. Jak dotąd zidentyfikowano 5 z 6 miejsc *N*-glikozylacji w *N*-końcowym regionie domeny

CLP białka CD44s. W domenie zewnątrzkomórkowej białka, przyległej do regionu transmembranowego, stwierdzono wiele miejsc potencjalnej *O*-glikozylacji, a także cztery powtórzenia dipeptydu Ser-Gly, które mogą być modyfikowane *O*-glikozydowo lub przez przyłączenie siarczanu chondroityny, bądź innych GAG [20]. Okazało się, że *O*-glikozylacja izoformy CD44H zmniejsza adhezję komórek raka jelita grubego linii KML4 i HT29 do płytek opłaszczonych HA [55]. Zahamowanie tej modyfikacji fenylo-*N*-acetylogalaktozaminą zwiększa ich przyleganie do tego ligandu, podczas gdy *N*-glikozylacja nie wpływa na ten proces. Z kolei podstawienie argininy w pozycji 41. alaniną pośrednio hamuje *O*-glikozylację izoformy CD44H poprzez zmiany konformacyjne w *N*-końcowej, konserwatywnej pętli B białka CD44. Cytowane wyniki wskazują, że *O*-glikozylacja zachodzi w obrębie konserwatywnej pętli B białka CD44, która może wiązać HA. Dasgupta i wsp. [55] sugerują, że modyfikacja ta zmienia konformację globularnej domeny *N*-końcowej antygeny CD44 lub zmniejsza jego silnie dodatni ładunek, co przyczynia się do zwiększenia powinowactwa do HA.

Mutacje w genie kodującym regiony CD44 ulegające *O*-glikozylacji czy modyfikacjom przez GAG np. dipeptydów Ser-Gly powodują spadek o połowę powinowactwa CD44 do HA [56]. Wspomniane mutacje powodują niewielkie zmiany masy cząsteczkowej kodowanego białka co sugeruje, że w obrębie reszt seryny przyłączane są *O*-glikozydowo krótkie łańcuchy oligosacharydowe, a nie rozbudowane cząsteczki GAG. Efektem zmian konformacyjnych, wywołanych przez podstawienie seryny w pozycji 258. glicyną, jest wzrost poziomu glikozylacji asparaginy w pozycji 255. Zaburzenia miejsc *N*-glikozylacji cząsteczki CD44 (przez mutacje w genie *CD44*) przyczyniają się do spadku jej masy cząsteczkowej nawet o 60-62 kDa oraz blokowania przyłączania innych ligandów m.in. fibronektyny, lamininy, kolagenu I i VI, siarczanu chondroityny oraz siarczanu heparanu. Powinowactwo do HA warunkuje skład oligosacharydów przyłączonych *N*-glikozydowo [61, 62]. Zastosowanie kapilarnej elektroforezy powinowactwa pozwoliło na analizę wpływu określonych oligosacharydów na powinowactwo CD44 do HA [63]. Kwas sjałowy przyłączony wiązaniem α -2,3-glikozydowo do oligosacharydów związanych *O*-glikozydowo z CD44 hamuje wiązanie HA, efekt zaś odwrotny wywiera przyłączenie: *N*-acetyloglukozoaminy wiązaniem *N*-glikozydowym, *N*-acetylogalaktozaminy do oligosacharydów związanych *O*-glikozydowo z CD44 oraz *O*-glikozylacja

cząsteczki CD44 pozbawionej *N*-przyłączonych oligosacharydów.

W komórkach raka trzustki BSp73 i włóknio- mięsaka BDX2 analizowano efekt przyłączenia GAG do CD44s i CD44v4-v7 na powinowactwo tych izoform do HA [64]. Okazało się, że izoforma CD44s wiąże jedynie HA, natomiast CD44v4-v7 przyłącza ponadto siarczan chondroityny A, B i C, heparynę oraz siarczan heparanu. Nie stwierdzono wiązania siarczanu keratanu. Asocjację poszczególnych GAG z izoformami CD44 określano po ich inkubacji z lizatami komórkowymi i precypitacji powstałych kompleksów za pomocą chlorku cetylopi- rydyny. Obserwacje Chiu i wsp. [65] wskazują, że domena izoformy CD44 kodowana przez ekson v10 odgrywa kluczową rolę w jej oddziaływaniu z siar- czanem chondroityny. Wymienione oddziaływania umożliwiają agregację cząsteczek CD44 oraz komór- rek, które zawierają na powierzchni izoformę CD44v10.

Wydaje się, że modyfikacja izoformy CD44H (opisywanej również jako CD44s) przez siarczan ke- ratanu odgrywa istotną rolę w regulacji wiązania HA i inwazyjności komórek [66]. Badaniami objęto dwa klonny komórki raka jelita grubego człowieka, tj. KM12L4 i KM12C6. Klon KM12L4 ulega intensyw- nej modyfikacji przez siarczan keratanu zaś słabo wiąże HA i jest silnie inwazyjny. Z kolei klon KM12C6 wiąże słabiej siarczan keratanu, a przyłącza więcej reszt HA, co wywołuje spadek zdolności do tworzenia przerzutów. Potraktowanie keratanazą komórek linii KM12L4, a także komórek HT29, usuwa większość siarczanu keratanu i umożli- wia wydajne przyłączanie HA. Siarczan keratanu po- dobnie jak w przypadku HA przyłącza się w obrębie konserwatywnej *N*-końcowej domeny białka CD44H [66].

Szczególne rolę tworzenia przerzutów nowotwo- rowych wydaje się odgrywać izoforma CD44v3, któ- ra jest modyfikowana przez siarczan heparanu [67]. Jednym z ligandów siarczanu heparanu jest czynnik HGF/SF (ang. *Hepatocyte Growth Factor/Scatter Factor*), który w jego obecności nagromadza się na powierzchni komórek lub/i podlega zmianom kon- formacyjnym zwiększającym powinowactwo do re- ceptora *c*-Met. Skutkiem wymienionych przemian jest fosforylacja reszt tyrozyny w obrębie *c*-Met, białek o m.c. 115 i 125 kDa oraz aktywacja kinaz ERK-1 i ERK-2. Powyższe zmiany obserwowano wyłącznie w obecności CD44v3 (nie zachodziły w obecności CD44s oraz CD44v8-10). Enzymatyczne usunięcie siarczanu heparanu z CD44v3 oraz zasto- sowanie jako ligandu cząsteczek HGF/SF o niewiel-

kim powinowactwie do siarczanu heparanu przyczy- nia się do blokowania transdukcji sygnału przez *c*-Met [67]. Nadekspresję izoformy CD44 wiążącej siarczan heparanu i receptor *c*-Met, która towarzyszy wielu typom nowotworów uważa się za czynnik pro- mujący ich wzrost oraz przerzuty [68, 69].

IV-2. Rola domeny cytoplazmatycznej i transmem- branowej CD44 w interakcjach z kwasem hia- luronowym

W interakcji białek rodziny CD44 z kwasem hia- luronowym okazał się również istotny segment do- meny cytoplazmatycznej cząsteczki między 311. a 330. aminokwasem. [20, 52, 57]. Fragment tej dome- ny, zawierający jedynie 6 aminokwasów umożliwia wiązanie HA, jeżeli domena transmembranowa CD44 zostanie zastąpiona przez analogiczny frag- ment cząsteczki CD3 (zeta), który stabilizuje dimery CD44 [70].

Fosforylacja reszt seryny w pozycjach 323. i 325. domeny cytoplazmatycznej polipeptydu CD44 człowieka nie wpływa na jego powinowactwo do opisywanego ligandu [71]. Okazało się, że podsta- wienia cząsteczek seryny przez glicynę i alaninę bądź kwas asparaginowy i kwas glutaminowy, które naśladują sterycznie, odpowiednio, nieufosforylo- wane i ufosforylowane reszty tego hydroksyamino- kwasu nie wpływają na powinowactwo białka CD44 do HA [72]. Mechanizmy regulujące interakcje białko-ligand na drodze fosforylacji reszt seryny do- meny cytoplazmatycznej wydają się być gatunkowo specyficzne. Natomiast fosforylacja seryny w pozy- cjach 325. i 327. antygeny CD44 zwiększa jego po- winowactwo do HA [73]. Aktualnie uważa się, że do- mena cytoplazmatyczna antygeny CD44 pełni rolę we właściwym jego usytuowaniu na błonie komór- kowej, optymalnym dla wiązania HA. Wydaje się, że może ułatwiać wiązanie HA albo przez oddziaływa- nia z innymi cząsteczkami tego proteoglikanu albo przez wiązanie niektórych białek cytoplazmatycz- nych [70, 72].

Antygen CD44 wiąże się w obrębie cytoplazmy z filamentami aktyny za pośrednictwem ezryny, radik- syny i moczyny [74]. Wiązanie ezryny zachodzi w obrębie 9-aminokwasowej sekwencji, złożonej z dwóch ciągów aminokwasów zasadowych. Mutacje punktowe genu *CD44* kodującego tę sekwencję nie wpływają na lokalizację CD44 w błonie komórkowej i interakcje z HA. Prawdopodobnie region ten uczestniczy w przekazywaniu sygnałów z zewnątrz komórki do jej wnętrza (ang. *outside-in*), a nie w kie- runku przeciwnym [75, 76].

Przedstawione ostatnio wyniki doświadczeń B o - u r g u i g n o n a i w s p . [77] wskazują na istotny udział w przekazywaniu sygnałów w kierunku na zewnątrz i do wnętrza komórki (ang. *inside-out* i *outside-in*) sekwencji obecnej w domenie cytoplazmatycznej CD44 wiążącej ankiryne (NSGNGAVE-DRKPSGL u człowieka i NGGNGTVEDRKPSSEL u myszy). Mutacje w genie *CD44* kodującym cytozaną sekwencję hamują przekaz informacji w obu kierunkach. Wyjaśnienie mechanizmu interakcji wspomnianego fragmentu domeny cytoplazmatycznej CD44 z ankiryne w transdukcji sygnałów w komórkach i ewentualnie w przebiegu karcynogenezy wymaga dalszych badań.

Wyniki doświadczeń wykorzystujących jako materiał doświadczalny limfocyty T wykazały asocjację domeny cytoplazmatycznej izoformy CD44s z kinazami tyrozynowymi p56^{lck} i Fyn należącymi do rodziny Src [78, 79]. Inkubacja limfocytów T w obecności przeciwciał anty CD44s prowadziła do wzrostu fosorylacji (na resztach tyrozyny) kilku białek wewnątrzkomórkowych o m.c. 140, 125, 100, 70, 50 i 45 kDa.

Uzyskane wyniki wskazujące na asocjację CD44s z kinazą (bądź kinazami) wewnątrzkomórkową potwierdziła immunoprecypitacja przeciwciałami anty CD44s ujawniając aktywność kinazową białka o m.c. 55-60 kDa [79].

Ewentualny udział domeny transmembranowej w regulacji oddziaływań CD44 z HA nie został dotąd rozstrzygnięty [80]. Prawdopodobnie rolę w tej interakcji odgrywa cysteina w pozycji 286., której udział nie wydaje się być związany wyłącznie z procesem dimeryzacji białka, gdyż podstawienie jej alaniną wywołuje zmiany konformacyjne, uniemożliwiające przyłączenie HA nawet w obecności przeciwciał F.10.42.2 powodujących agregację cząsteczek CD44.

V. Ekspresja izoform CD44 w nowotworach jelita grubego

Dzięki osiągnięciom biologii i onkologii molekularnej zaproponowano model uwzględniający prawdopodobną sekwencję zmian genetycznych w rozwoju nowotworów jelita grubego [81]. W procesie transformacji nowotworowej komórek następują uszkodzenia i zmiany strukturalne w obrębie genów supresorowych, onkogenów i genów mutatorowych prowadzące do zmian struktury i funkcji białek przez nie kodowanych [82]. Identyfikacja takich zmian towarzyszących rozwojowi fenotypu złośliwego dotychczas prawidłowych komórek niesie nadzieję w

znalezieniu markerów molekularnych o zadowalającej czułości i swoistości, służących do detekcji stanów poprzedzających nowotworzenie, wczesne stadia nowotworzenia oraz do prognozowania i monitorowania choroby nowotworowej. Wśród klinicznych markerów karcynogenezy jelita grubego (głównie stadium progresji) wymienia się przede wszystkim produkt genu *p53* oraz cząsteczkę adhezyjną — proteoglikan CD44 [83-87].

Badania rozmieszczenia izoform CD44 w obrębie ściany jelita grubego metodami immunocytochemicznymi ujawniły, że CD44s dominuje w obrębie błony właściwej (*lamina propria*) prawidłowej błony śluzowej jelita [88-90]. W mniejszych ilościach izoforma ta występuje we wszystkich komórkach prawidłowego nabłonka jelitowego. Natomiast wariant CD44v9 wykryto jedynie w części podstawnej prawidłowych krypt jelita grubego [83], w której nie występowały izoformy: CD44v3, CD44v4, CD44v6 i CD44v7. Epitopy domen, zawierających produkt ekspresji CD44v2-v10 oraz mRNA izoformy CD44v2-v10, zaobserwowano również w prawidłowej błonie śluzowej jelita [83, 89]. Wzrost ekspresji izoform CD44v, oceniany na podstawie zawartości mRNA i białek z wykorzystaniem technik hybrydyzacji *in situ*, RT-PCR oraz metod immunocytochemicznych, wydaje się być zjawiskiem charakterystycznym dla wczesnych faz rozwoju raka jelita grubego [90, 91]. Wskazuje na to istnienie zależności między mutacjami genu *Apc* i zakłóceniami szlaku sygnałowego β -katenina/Tcf-4 [92]. Mutacje genu *Apc* uniemożliwiają wiązanie jego nieprawidłowego produktu białkowego z β -kateniną i prowadzą do wzrostu poziomu β -kateniny w cytoplazmie. Z kolei β -katenina asocjuje z czynnikiem transkrypcyjnym Tcf-4 i w formie kompleksu jest przenoszona do jądra komórkowego, gdzie reguluje ekspresję szeregu genów, m.in. *CD44*. Mutacje genu *Apc* u myszy transgenicjnych oraz w gruczolakorakach jelita grubego wywołują wzrost ekspresji *CD44* wskutek aktywacji szlaku sygnałowego β -katenina/Tcf-4. Z kolei mutacje genu *Tcf-4* u myszy hamują ekspresję *CD44* w nabłonku jelita [92].

Proces transformacji nowotworowej komórek różnych typów, w tym także komórek nabłonka jelita grubego, może przyczyniać się do przemieszczania się komórek zmienionych nowotworowo do struktur limfatycznych, a w następstwie do tworzenia się przerzutów narządowych [7, 8, 12, 93].

Na podkreślenie zasługują zaobserwowane przez M u l d e r a i w s p . [83] różnice w ekspresji izoform CD44v5 i CD44v6 w nabłonku części proksymalnej i dystalnej jelita grubego. Analiza preparatów z no-

wotworów tych odcinków przewodu pokarmowego 64 pacjentów techniką immunocytochemiczną z zastosowaniem przeciwciał monoklonalnych rozpoznających powyższe izoformy, wykazała pozytywne reakcje z przeciwciałami anty CD44v5 w około 90% badanych przypadków i z przeciwciałami anty CD44v6 w około 69%. Badacze ci zaobserwowali ponadto, że ekspresja obydwu opisanych izoform białka CD44 częściej występuje w proksymalnej części jelita grubego. Pozytywna reakcja z przeciwciałami przeciwko CD44v5 występowała w 20 z 23 (87%) raków części proksymalnej i w 21 z 40 (52%) raków części dystalnej. Dane te sugerują pewną odrębność genetyczną nowotworów powstających w wymienionych odcinkach jelita grubego.

Analiza poziomu mRNA izoform: CD44v6-7, nabłonkowej — CD44E oraz hemopoetycznej (standardowej) — CD44s/H określonego poprzez RT-PCR oraz technikę hybrydyzacji Southern w dysplastycznym (gruczolaki od postaci łagodnej do ostrej) i zmienionym nowotworowo (gruczolakoraki o różnym stopniu zaawansowania) nabłonku jelita grubego 44 pacjentów wykazała, że izoformy CD44v6-7 i CD44E pojawiają się już w stadium gruczolaka [91]. Poziom obydwu tych izoform był śladowy bądź niewykrywalny w prawidłowym nabłonku jelita, w leukocytach czy w wątrobie. Okazuje się, że iloraz CD44E/H może wskazywać na zmiany w biosyntezie obydwu izoform podczas dysplazji i nowotworzenia jelita grubego. Iloraz ten był zdecydowanie odmienny w komórkach nabłonka prawidłowego, gruczolakach i gruczolakorakach tego narządu i wynosił odpowiednio: 0,1; 1,8 i 0,7. Wartości średnie ilorazu CD44E/H określone w guzach pierwotnych jelita grubego i jego przerzutach do węzłów chłonnych czy wątroby były zbliżone — odpowiednio: $0,7 \pm 0,5$ i $0,7 \pm 0,6$. Parametr ten nie jest specyficzny zatem dla ujawnienia przerzutów gruczolakoraków jelita grubego, ale wydaje się być istotny dla wychwycenia zmian dysplastycznych nabłonka jelita w kierunku konwersji w guz pierwotny [91].

Wykorzystując monoklonalne przeciwciała rozpoznające izoformę CD44v8-v10 o m.c. około 130 kDa, udało się wykazać brak immunocytochemicznej reakcji w śluzówce prawidłowej, z wyjątkiem podstawy krypt jelita grubego [94]. Natomiast zmiany nowotworowe błony śluzowej, o różnym stopniu zróżnicowania, 215 pacjentów cechował odmienny poziom immunoreaktywności tej izoformy. Oszacowano, że w toku postępującego nowotworzenia jelita grubego, opisywanego jako stadium T2, T3 i T4 rośnie odsetek pozytywnych reakcji z przeciwciałami

anty CD44v8-10, osiągając odpowiednio: 37,8%, 47,4% i 50,7%. Ekspresję CD44v8-v10 zidentyfikowano u 55,3% pacjentów z przerzutami do węzłów chłonnych i u 38,4% bez takich przerzutów. Na podkreślenie zasługuje wysoka, wykrywana aż w 78,7%, obecność CD44v8-v10 u chorych z przerzutami narządowymi.

Prawdopodobnie obserwowane w wielu laboratoriach różnice w poziomie ekspresji izoform CD44 określane metodą immunocytochemiczną są wywołane nie tylko zmienioną ich syntezą ale również odmienną dostępnością ich epitopów spowodowaną np. przez glikozylację CD44 [90].

VI. Znaczenie detekcji izoform CD44 w diagnostyce onkologicznej

Częste występowanie różnych izoform antygeny CD44 w nowotworach, wiążą badacze z ich funkcją, zarówno w rozwoju nowotworów pierwotnych, jak i w formowaniu przerzutów [14, 83, 84, 95]. Pojawienie się izoform CD44 w płynach ustrojowych czy wydzielinach takich jak ślina, mocz lub kał pacjentów stanie się być może w niedalekiej przyszłości sygnałem obecności komórek nowotworowych. Guo i wsp. [93] wykazali, że w surowicy chorych z rakiem jelita grubego występuje rozpuszczalna forma CD44 pozbawiona domeny transmembranowej i cytoplazmatycznej, a jej poziom koreluje z rozmiarami guza i zdolnością do tworzenia przerzutów. Okazało się, że po usunięciu nowotworu dochodzi do spadku stężenia tej formy CD44 w surowicy. Powyższe wyniki rodzą nadzieję, że rozpuszczalne formy CD44 znajdą zastosowanie jako markery progresji choroby nowotworowej i efektów jej leczenia [56, 88, 96, 97].

Analizy surowicy 44 pacjentów przeprowadzone przy zastosowaniu techniki ELISA (ang. *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) wskazują na ujemną korelację między stężeniem izoformy CD44v6 w osoczu a odsetkiem osób z 5 letnim okresem przeżycia po resekcji guza [98].

Uważa się ponadto, że poziom izoform CD44v6 i CD44v10 w złuszczonej komórce nabłonka jelita grubego wykrywanych w kale może stanowić czynnik prognostyczny dla dalszych losów pacjentów. Okazało się, że przy nawrotach choroby nowotworowej lub podczas tworzenia przerzutów obserwuje się wzrost zawartości tych izoform [42, 44, 45]. Ponadto, potwierdzono doświadczalnie, że zawartość mRNA izoform CD44v6 i CD44v10 stanowić może znacznik procesu nowotworzenia, a spadek ich zawartości efekt stosowanego leczenia.

Dotychczas stosowane inwazyjne metody diagnozowania nowotworów wymagają naruszenia powłok ciała pacjenta w celu pobrania krwi lub fragmentów tkankowych. Ostatnio grupa japońskich badaczy [96] zaproponowała nieinwazyjny test oparty na technice RT-PCR oraz hybrydyzacji Southern, którym potwierdza się ekspresję izoform CD44v6 i CD44v10 w złuszczonej komórce nabłonka jelitowego w kale chorych. Testem tym zidentyfikowano w analizowanym materiale izoformy CD44v6 i CD44v10 odpowiednio u 17 (68%) i 15 (60%) spośród 25 pacjentów. Na podkreślenie zasługuje, że obecność tych izoform odnotowano już we wczesnych fazach rozwoju raka jelita grubego. Obie izoformy CD44 zidentyfikowano w 5 (62,5%) z 8 analizowanych nowotworów w stadium zaawansowania A według D u k e s a. Po usunięciu operacyjnym guzów nowotworowych, ekspresja izoform CD44v6 i CD44v10 w złuszczonej komórce nabłonka jelita grubego utrzymywała się odpowiednio u 3 (12%) i 7 (28%) z 25 pacjentów. Wydaje się, że obecność wymienionych izoform w badanym materiale części pacjentów, po zabiegach operacyjnych, może wynikać z ich ekspresji przez dysplastycznie zmieniony nabłonek jelitowy (gruczolaki) lub utrzymywanie się procesu zapalnego, który powoduje aktywację limfocytów T [96].

Znaczenie prognostyczne może mieć również oznaczenie względnej zawartości izoform CD44v6 i CD44s w komórkach części zewnętrznej (nabłonek) i wewnętrznej guza oraz macierzy zewnątrzkomórkowej jego części wewnętrznej [97]. Analizy immunohistochemiczne 133 preparatów nowotworów jelita grubego ujawniły, że izoforma CD44v6 występuje najczęściej w komórkach nabłonka, a w mniejszym stopniu w komórkach części wewnętrznej guza oraz w macierzy zewnątrzkomórkowej, tj. odpowiednio 77, 17 i 12%. Natomiast izoforma CD44s jest rozmieszczona bardziej równomiernie, zaś reakcje pozytywne odnotowano odpowiednio w 85, 98 i 90% komórek części wewnętrznej i zewnętrznej guza oraz macierzy zewnątrzkomórkowej. Brak CD44s w obrębie macierzy zewnątrzkomórkowej części wewnętrznej guza jest związany z pogorszeniem prognozowania.

Duże nadzieje wnoszą wyniki badań wykorzystujących modulację poziomu izoformy CD44v6 za pomocą antysensownych RNA, ograniczające powstawanie przerzutów narządowych raka jelita grubego. Wykazano bowiem, że podanie myszom doświadczalnym antysensownego RNA blokowało powstawanie przerzutów wątrobowych po dootrzewno-

wej iniekcji komórek nowotworu jelita grubego — HT29 [98]. Zbliżony wynik uzyskano u myszy po iniekcji przeciwciał monoklonalnych anty CD44.

Wstępne obserwacje z zastosowaniem przeciwciał anty CD44v7 roją nadzieję na możliwość hamowania rozwoju przewlekłych stanów zapalnych jelita grubego, uważanych za stany przedrakowe tego narządu [99].

VII. Uwagi końcowe

Białkowym produktem *CD44* jest znacznych rozmiarów polipeptyd o zmiennej długości cząsteczki wynikającej z alternatywnego składania pierwotnego transkryptu tego genu oraz różnego stopnia jego glikozylacji. Mnogość izoform antygenu CD44, które tworzą rodzinę glikoprotein, a z uwagi na wiązanie HA — hialoadheryn, tłumaczy ich udział w wielu funkcjach organizmów eukariotycznych, m.in. adhezji, migracji, proliferacji, różnicowaniu komórek, transdukcji sygnałów [10-17, 76, 78, 79, 92].

Ta różnorodność pełnionych funkcji wynika ze zdolności członków tej rodziny do interakcji ze składnikami macierzy zewnątrzkomórkowej (kwas hialuronowy, kolagen, fibronektyna), a także wpływu na organizację cytoszkieletu.

Liczne wyniki badań wskazują, że karcynogenezie wielu narządów i komórek towarzyszy zwiększona ekspresja różnych izoform CD44, w których występują fragmenty łańcucha kodowane przez jeden czy więcej eksonów zmiennych genu *CD44* [42, 44, 45, 96]. Deteckcja określonych izoform CD44 może mieć ważne znaczenie w diagnostyce onkologicznej umożliwiając wykrywanie nawet nielicznych komórek nowotworowych w płynach ustrojowych i wydzielinach pacjentów (krew, ślina, mocz czy kał pacjentów). Niektórzy badacze lansują pogląd, że ekspresja izoform CD44 zawierających informację zawartą w eksonach zmiennych (m.in. v4, v6, v6-v7, v10) może stanowić jedno z wcześniejszych wydarzeń w rozwoju nowotworów jelita grubego, podobnie jak mutacje genu *Apc* i onkogenu *K-ras* [81, 82, 91]. Dużego znaczenia nabierają wyniki tych badań w których udowodniono, że zwiększona ekspresja niektórych izoform antygenu CD44 (CD44v3, CD44v8-v10) towarzyszy nowotworom jelita grubego i innych narządów, szczególnie w stadium progresji, gdy dochodzi do tworzenia przerzutów nowotworowych [89, 91, 92]. Wykrycie w surowicy pacjentów z nowotworami jelita grubego oraz żołądka krążącej izoformy CD44, której poziom koreluje z wielkością guzów, a także zdolnością metastatyczną

sugeruje, że może ona odgrywać rolę cennego znacznika progresji nowotworów i monitorowania efektów terapii wielu nowotworów [56, 88, 96, 97].

Chociaż mechanizm(y) udziału glikoprotein rodziny CD44 w nowotworzeniu jelita grubego (i innych nowotworów) nie jest sprecyzowany rozważa się kilka możliwości przez które grupa tych makrocząsteczek może w nim uczestniczyć:

1° CD44 stanowiąc główny komórkowy receptor powszechnie występującego glikozaminoglikanu — kwasu hialuronowego poprzez interakcje z tym ligandem mogą przyczyniać się do zwiększenia ruchliwości komórek, przyspieszonego wzrostu guzów pierwotnych i ich przerzutów [55, 59];

2° w połączeniach z siarczanem heparanu (m.in. izoforma CD44v3) jako siarczanowe proteoglikany mogą pełnić regulatorową funkcję we wzroście i ruchliwości komórek przez wiązanie się do czynników wzrostu np. HGF/SF i włączanie drogi sygnałowej poprzez receptor c-Met [67, 92];

3° nadekspresja izoform CD44 może blokować apoptozę komórek, a w konsekwencji przedłużać ich życie, prowadząc do rozwoju guzów pierwotnych, a następnie ich przerzutów.

Tę ostatnią możliwość, jak dotąd traktuje się jako sygnałną i rozważa jako jeden z mechanizmów nowotworzenia raka sutka [92, 100].

Artykuł otrzymano 4 stycznia 1999 r.

Zaakceptowano do druku 30 sierpnia 1999 r.

Piśmiennictwo

1. Koźma EM, Głowacki A, Oleczyk K, Jaźwiec M (1997) *Post Biochem* **43**: 158-172
2. Bobiński R, Oleczyk K., Krzyzowska-Bobińska E (1998) *Post Biochem* **44**: 245-251
3. Bohr J., Gniot-Szulżycka J (1998) *Post Biochem* **44**: 208-215
4. Trowbridge IS, Lesley J, Schulte R, Hyman R, Trotter J (1982) *Immunogenetics* **15**: 299-312
5. Günthert U (1996) *Curr Topics Microbiol Immunol* **213**: 271-285
6. Günthert U, Stauder R, Mayer B, Terpe H-J, Finke L, Friedrichs K (1995) *Cancer Surv* **24**: 19-42
7. Ruiz P, Günthert U (1996) *World J Urol* **14**: 141-150
8. Nelson RM, Venot A, Bevilacqua MP, Linhardt RJ, Stamenkovic I (1995) *Ann Rev Cell Dev Biol* **11**: 601-631
9. Underhill Ch (1992) *J Cell Sci* **103**: 293-298
10. Stauder R, Günthert U (1995) *Immunologist* **3**(3): 77-83
11. Culty M, Miyake K, Kincaid PW, Sikorski E, Butcher EC, Underhill C (1990) *J Cell Biol* **111**: 2765-2774
12. Goebeler M., Kaufmann D, Brocker E-B, Klein CE (1996) *J Cell Sci* **109**: 1957-1964
13. Henke CA, Roongta U, Mickelson DJ, Knutson JR, McCarthy JB (1996) *J Clin Invest* **97**: 2541-2552
14. Combaret V, Lasset C, Frappaz D, Bouvier R, Thiesse P, Rebillard A-C, Philip T, Favrot MC (1995) *Eur J Cancer* **32A**: 545-549
15. Khaldoyanidi S, Schnabel D, Föhr N, Zöller M (1997) *Br J Haematol* **96**: 31-45
16. Mackay ChR, Imhof BA (1993) *Immunol Today* **14**: 99-102
17. Ponta H, Wainwright D, Herrlich P (1998) *Int J Biochem Cell Biol* **30**: 299-305
18. Goodfellow PN, Banting G, Wiles MV, Tunnac-life A, Parkar M, Dalchau R, Fabre JW (1982) *Eur J Immunol* **12**: 659-663
19. Forsberg UH, Jalkanen S, Schroder J (1989) *Immunogenetics* **29**: 405-407
20. Borland G, Ross JA, Guy K (1998) *Immunology* **93**: 139-148
21. Stamenkovic I, Amiot M., Pesando JMP, Seed B (1989) *Cell* **56**: 1057-1062
22. Stamenkovic I, Aruffo A, Amiot M, Seed B (1991) *EMBO J* **10**: 343-348
23. Günthert U (1993) *Curr Topics Microbiol Immunol* **184**: 47-63
24. Sreanot GR, Bell MV, Jackson DG, Cornelis FB, Gerth U, Bell JI (1992) *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 12160-12164
25. Goldstein LA, Butcher EC (1990) *Immunogenetics* **32**: 389-397
26. Dougherty GJ, Lansdorp PM, Cooper DL, Humphries RK (1991) *J Exp Med* **174**: 1-5
27. Ehnis T, Dietrich W, Bauer M., Von Lampe B, Schuppan D (1996) *Exp Cell Res* **229**: 388-397
28. Toole BP (1990) *Curr Opin Cell Biol* **2**: 839-844
29. Seelentag WKF, Günthert U, Saremaslani P, Futo E, Madelaine P, Heitz PU, Roth J (1996) *Histochem Cell Biol* **106**: 283-289
30. Seelentag WKF, Günthert U, Saremaslani P, Futo E, Pfaltz M, Heitz PU, Roth J (1996) *Int J Cancer* **69**: 218-224
31. Bankfalwi A, Terpe H-J, Breukelmann D, Bier B, Rempe D, Pshadka G, Kreech R, Beker W (1998) *Histopathology* **33**: 107-116
32. Gurice N, Gairard B, Marcellin L, Wilk A, Calderoli H, Renaud R, Bergerat J-P, Oberling F (1997) *Int J Oncol* **10**: 171-175
33. Yamamichi K, Uehara Y, Kitamura N, Nakane Y, Hioki K (1998) *Int J Cancer* **79**: 256-262
34. Friedrichs K, Franke F, Lisboa B-W, Kugler G, Gille, Terpe H-J, Hölzel F, Maass, Günthert U (1995) *Cancer Res* **55**: 5424-5433
35. Ristamäki R, Hoensuu H, Söderström K-O, Jalkanen S (1995) *J Pathol* **176**: 259-267
36. Terpe H-J, Koopmann R, Imhof B A, Günthert U (1994) *J Pathol* **174**: 89-100
37. Ariza A, Mate JL, Isamat M, Lopez D, Von Uexküll-Güldeband C, Roselli R, Fernandez-Vasalo A, Navas-Palacios JJ (1995) *J Pathol* **177**: 363-368
38. König H, Moll J, Ponta H, Herrlich P (1996) *EMBO J* **15**: 4030-4039
39. König H, Ponta H, Herrlich P (1998) *EMBO J* **17**: 2904-2913
40. Bell MV, Cowper AE, Lefranc MP, Bell JI, Sreanot GR (1998) *Front Biosci* **18**: 5930-5941
41. Aruffo A, Stamenkovic I, Melnick M., Underhill C (1990) *Cell* **61**: 1303-1313
42. Tanabe KK, Saya H (1994) *Crit Rev Oncogenesis* **5**: 201-212
43. Wang Ch, Tammi M., Guo H, Tammi R (1996) *Am J Pathol* **148**: 1861-1869
44. Kohda D, Morton CJ, Parkar AA, Hatanaka H, Inagaki FM, Campbell ID, Day AJ (1996) *Cell* **86**: 767-775
45. Knudson W (1996) *Am J Pathol* **148**: 1721-1726
46. Knudson W (1998) *Front Biosci* **3**: D604-615
47. Yeo TK, Nagy JA, Yeo K-T, Dvorak HF, Toole BP (1996) *Am J Pathol* **148**: 1733-1740
48. Liao HX, Lee DM, Levesque MC, Haynes BF (1995) *J Immunol* **55**: 3938-3945
49. Peach RJ, Hollenbaugh D, Stamenkovic I, Aruffo A (1993) *J Cell Biol* **122**: 257-26

50. Yang B, Yang BL, Savani RC, Turley EA (1994) *EMBO J* **13**: 286-296
51. Van der Voort R, Mantenhorst E, Smith L, Ostermann E, Van den Bergh F, Pals ST (1995) *Biochem Biophys Res Commun* **214**: 137-144
52. Telen MJ, Udani M, Washington MK, Levesque MC, Lloyd E, Rao N (1996) *J Biol Chem* **271**: 7147-7153
53. Dougherty GJ, Cooper DL, Memory JF, Chiu RK (1994) *J Biol Chem* **269**: 9074-9078
54. Bartolazzi A, Nocks A, Aruffo A, Spring F, Stamenkovic I (1996) *J Cell Biol* **132**: 1199-1208
55. Dasgupta A, Takahashi K, Cutler M., Tanabe KK (1996) *Biochem Biophys Res Commun* **227**: 110-117
56. He Q, Lesley J, Hyman R, Ishihara K, Kincade PW (1992) *J Cell Biol* **119**: 1711-1719
57. Liu D, Liu T, Li R, Sy MS (1998) *Front Biosci* **3**: D631-636
58. Lesley J, Kincade PW, Hyman R (1993) *Eur J Immunol* **23**: 1902-1909
59. Sleeman J, Rudy W, Hofmann M, Herrlich P, Ponta H (1996) *J Cell Biol* **135**: 1139-1150
60. Tanaka AS, Adams DH, Hübscher S, Hirano H, Siebenlist U, Shaw S (1993) *Nature* **361**: 79-82
61. English NM, Lesley JF, Hyman R (1998) *Cancer Res* **58**: 3736-3742
62. Katoh S, Zheng Z, Oritani K, Shimozato T, Kincade PW (1995) *J Exp Med* **182**: 419-429
63. Skelton TP, Zeng C, Nocks A, Stamenkovic I (1998) *J Cell Biol* **140**: 431-446
64. Sleeman JP, Arming S, Moll JF, Hecke A, Rudy W, Sherman LS, Kreil G, Ponta H, Herrlich P (1996) *Cancer Res* **56**: 3134-3141
65. Chiu RK, Droll A, Dougherty ST, Carpenito C, Cooper DI, Dougherty GJ (1999) *Exp Cell Res* **248**: 314-321
66. Takahashi K, Stamenkovic I, Cutler M., Dasgupta A, Tanabe KK (1996) *J Biol Chem* **271**: 9490-9496
67. van der Voort R, Taher TEJ, Wielenga VJM, Spargaren M, Prevo R, Smit L, David G, Hartmann G, Gherardi E, Pals ST (1999) *J Biol Chem* **274**: 6499-6506
68. Di Renzo MF, Poulson R, Olivero M., Comoglio PM, Lemoine NR (1995) *Cancer Res* **55**: 1129-1138
69. Di Renzo MF, Olivero M., Giacomini A, Porte H, Chastre E, Mirossay L, Nordlinger B, Bretti B, Bottardi S, Giordano S, Plebani M, Gespach C, Comoglio PM (1995) *Clin Cancer Res* **1**: 147-154
70. Perschl A, Lesley J, English N, Trowbridge I, Hyman R (1995) *Eur J Immunol* **25**: 495-501
71. Neame SJ, Isacke CM (1992) *EMBO J* **11**: 4733-4738
72. Uff CR, Neame SJ, Isacke CM (1995) *J Immunol* **25**: 1883-1887
73. Pure E, Camp RL, Peritt D, Panettieri RAJ, Lazaar AL, Nayak S (1995) *J Exp Med* **181**: 55-62
74. Tsukita S, Oishi K, Sato N, Sagara J, Kawa IA, Tsukita S (1994) *J Cell Biol* **126**: 391-401
75. Yonemura S, Hirao M, Doi Y, Takahashi N, Konodo T, Tsukita S (1998) *J Cell Biol* **140**: 885-895
76. Legg J. W, Isacke CM (1998) *Curr Biol* **8**: 705-708
77. Bourguignon LYW, Zhu D, Zhu H (1998) *Front Biosci* **3**: D647-305
78. Ilangumaran S, Briol A, Hoessli DC (1998) *Blood* **91**: 3901-3908
79. Taher TEJ, Smit L, Arjan WG, Schilder-Tol EJM, Borst J, Pals ST (1996) *J Biol Chem* **271**: 2863-2867
80. Neame SJ, Uff CR, Wheatley SC, Isacke CM (1995) *J Cell Sci* **108**: 3127-3135
81. Fearon ER, Vogelstein B (1990) *Science* **61**: 759-761
82. Kinzler KW, Vogelstein B (1996) *Cell* **87**: 159-170
83. Mulder JWR, Kruyt PM, Sewnath M, Seldenrijk CA, Weidema WF, Pals ST, Offerhaus GJA (1995) *Br J Surg* **82**: 1468-1470
84. Mulder JWR, Kruyt PM, Sewnath M, Oosting J, Seldenrijk CA, Weidema WF, Offerhaus GJA, Pals ST (1994) *Lancet* **344**: 1470-1472
85. Mulder JWR, Wielenga VJM, Pals ST, Offerhaus GJA (1997) *Histochem J* **29**: 439-452
86. Gotley DC, Fawcett J, Walsh MD, Reeder JA, Simmons DL, Antalis TM (1996) *Br J Cancer* **74**: 342-351
87. Wielenga VJM, van der Voort R, Mulder JWR, Kruyt PM, Weidema F, Oosting J, Van Krimpen C, Offerhaus GJA, Pals ST (1998) *Scand J Gastroenterol* **33**: 82-87.
88. Higashikawa K, Yokozaki H, Ue T, Taniyama K, Ishikawa T, Tarin D, Tahara A (1996) *Int J Cancer* **66**: 11-17
89. Wong LS, Cantril JE, Morris AG, Fraser IA (1997) *Br J Surg* **84**: 363-367
90. Herrlich P, Pals S, Ponta H (1995) *Eur J Cancer* **31A**: 1100-1112
91. Imazeki F, Yokosuka O, Yamaguchi T, Ohta M, Isono K, Omata M (1996) *Gastroenterology* **110**: 362-368
92. Wielenga VJM, Smits R, Korinek V, Smit L, Kielman M., Fodde R, Clevers H, Pals ST (1999) *Am J Pathol* **154**: 515-523
93. Guo Y-J, Liu G, Wang X, Jin D, Wu M, Ma J, Sy MS (1994) *Cancer Res* **54**: 422-426
94. Yamaguchi A, Urano T, Goi T, Saito M, Takeuchi K, Hirose K, Nakagawara G, Shiku H, Furukawa K (1996) *J Clin Oncol* **14**: 1122-1127
95. Bhatavdekar JM, Patel DD, Chikhlikar PR, Trivedi TI, Gosalia NM, Ghosh N, Shah NG, Vora HH, Suthar TP (1998) *Ann Surg Oncol* **5**: 495-501
96. Yamao T, Matsumura Y, Shimada Y, Motiya Y, Sugihara KJ, Akasu T, Fujita S, Kakizoe T (1998) *Gastroenterology* **114**: 1196-1205
97. Yamaguchi A, Saito M, Goi T, Iida A, Takeuchi K, Hirose K, Nakagawara G, Furukawa K, Shiku H (1995) *Jpn J Cancer Res* **86**: 1166-1171
98. Furuta K, Zahurak M, Goodman SN, Hamilton SR, August JT (1998) *Clin Cancer Res* **4**: 21-29
99. Wittig B, Schwarzler Ch, Fohr N, Günther U, Zöller M (1998) *J Immunol* **161**: 1069-1073
100. Yu Q, Toole BP, Stamenkovic J (1997) *J Exp Med* **186**: 1985-1996

Izoformy aktyny — zróżnicowanie funkcji, zmiany w stanach patologicznych

Actin isoforms — functional differentiation, the changes in the cell pathology

DOROTA NOWAK¹, MARIA MALICKA-BŁASZKIEWICZ²

Spis treści

- I. Wprowadzenie
- II. Heterogenność molekularna aktyny
- III. Zróżnicowanie funkcji izoaktyn cytoplazmatycznych
- IV. Aktyna w stanach patologicznych komórki
 - IV-1. Architektura cytoszkieletu aktynowego w komórkach nowotworowych
 - IV-2. Zmiany ekspresji izoform aktyny w nowotworach
 - IV-3. Izoformy aktyny w innych procesach chorobowych
- V. Podsumowanie

Wykaz skrótów: α SMA — aktyna α z mięśni gładkich, γ SMA — aktyna γ z mięśni gładkich, komórki Ito — komórki gwiaździste, występujące w wątrobie obok hepatocytów i komórek Kupffera.

I. Wprowadzenie

Aktyna występuje powszechnie w organizmach eukariotycznych niezależnie od stopnia ich rozwoju. Mikrofilamenty aktynowe wraz z mikrotubulami i filamentami pośrednimi tworzą szkielet komórki. Aktyna jest obecna w cytoplazmie i w jądrze, w którym stanowi komponentę białek chromatyny, podtrzymującą jej strukturę i strukturę jądra [1, 2]. Jest białkiem wielofunkcyjnym, poza rolą strukturalną uczestniczy w wielu procesach istotnych dla prawidłowego funkcjonowania komórki, takich jak m.in. wewnątrzkomórkowy ruch organelli i chromosomów [3, 4], wydzielanie [5], przekazywanie informacji i indukcja odpowiedzi biochemicznej [6, 7].

¹Dr; ²prof. nadzw. dr hab., Instytut Biochemii i Biologii Molekularnej Uniwersytetu Wrocławskiego, Zakład Patologii Komórki, ul. Przybyszewskiego 63, 51-148 Wrocław, e-mail: mmnb@angband.microb.uni.wroc.pl

Contents

- I. Introduction
- II. Molecular heterogeneity of actin
- III. Functional differentiation of cytoplasmic isoactins
- IV. Actin in the cell pathology
 - IV-1. Architecture of actin cytoskeleton in cancer cells
 - IV-2. The changes in the expression of actin isoforms in the tumor cells
 - IV-3. Actin isoforms in the other cell pathologies
- V. Summary

Zainteresowanych powyższymi zagadnieniami odsyłamy do wybranych prac przeglądowych autorstwa Pollarda i Coopera [8], Carlier [9], Sheterline'a i wsp. [1], Bremera i Aebi [10], Janmey i Chaponnier [11] oraz literatury w nich zebranej.

Celem niniejszego opracowania jest próba odpowiedzi na pytanie, jakie jest znaczenie obecności wielu izoform aktyny w komórce, czy istnieje zróżnicowanie funkcji poszczególnych izoaktyn i ich związek z określonymi schorzeniami.

II. Heterogenność molekularna aktyny

Aktyna jest białkiem konserwatywnym, wykazującym jednakże heterogenność molekularną [12-16]. Występuje w materiale biologicznym w postaci sześciu izoform: dwu form w mięśniach poprzecznie prążkowanych (aktyny α z mięśni szkieletowych i aktyny α z mięśnia sercowego), aktyny α i γ z mięśni gładkich oraz dwu izoaktyn cytoplazmatycznych — β i γ . Izoformy aktyny, ze względu na niewielkie różnice punktu izoelektrycznego (pI), rozróżniono metodą ogniskowania izoelektrycznego. Różnice te wynikają przede wszystkim ze zmian składu aminokwasowego izoform w najbardziej zmiennym rejonie łańcucha polipeptydowego akty-

ny, „kwaśnym” końcu N (Tabela 1). Wartości pI izoaktyń, określane przez wielu badaczy wahają się w granicach od 5,2 do 5,7 [17-19], przy czym punkty

podczas, lub krótko po zakończeniu translacji. Funkcjonalne znaczenie acetylacji nie jest znane. Wiadomo jednak, że zmutowana, niezacetylowana aktyna

Tabela 1.

Porównanie sekwencji aminokwasowych końca N izoform aktyny oraz białek aktynopodobnych wg Herman [25] (zmodyfikowano).

Sekwencje podkreślone przedstawiają rejony konserwatywne. Aminokwasy zaznaczone tłustym drukiem to cząsteczki usuwane podczas posttranslacyjnej modyfikacji końca N. ACTL — „*actin like*”; aktyna-RPV — „*actin related protein vertebrates*”.

Izoforma aktyny	Sekwencja końca N
β cytoplazmatyczna γ cytoplazmatyczna γ mięśni gładkich	<u>M-D-D-D-I-A-A-L-V-V-D-N-G-S-G-M-C-K</u> <u>M-E-E-E-I-A-A-L-V-I-D-N-G-S-G-M-C-K</u> <u>M-E-E-E-T-T-A-L-V-C-D-N-G-S-G-L-C-K</u>
α mięśnia sercowego α mięśnia szkieletowego α mięśni gładkich	<u>M-C-D-D-E-E-T-T-A-L-V-C-D-N-G-S-G-L-V-K</u> <u>M-C-D-E-D-E-T-T-A-L-V-C-D-N-G-S-G-L-V-K</u> <u>M-C-E-E-E-D-S-T-A-L-V-C-D-N-G-S-G-L-C-K</u>
białka aktynopodobne: Saccharomyces cerevisiae, Act2 Schizosaccharomyces pombe, Act2 Caenorhabditis elegans, ACTL Aktyna-RPV Centraktyna	M-D-P-H-N-P-I-V-L-D-O-G-T-G-F-V-K M-A-S-F-N-V-P-I-I-M-D-N-G-T-G-Y-S-K M-D-S-Q-G-R-K-V-I-V-D-N-G-T-G-F-V-K M-E-S-Y-D-V-I-A-N-O-P-V-V-I-D-N-G-S-G-V-I-K M-E-S-Y-D-V-I-A-N-O-P-V-V-I-D-N-G-S-G-V-I-K

izoelektryczne aktyn cytoplazmatycznych są zawsze nieznacznie przesunięte w kierunku alkalicznym w stosunku do aktyn mięśniowych. W cytoplazmie komórek epitelialnych jelita szczura wykazano, obok izoform β i γ, obecność dwóch dodatkowych aktyn nieznacznie różniących się wartościami pI [20]. Brak jednak doniesień na temat szerszego występowania tych białek u innych gatunków kręgowców.

Izoformy aktyny wykazują specyficzność tkankową, przy braku specyficzności gatunkowej. Oznacza to, że obserwuje się więcej różnic w składzie aminokwasowym aktyn z różnych tkanek zwierząt tego samego gatunku, niż w przypadku aktyn z tych samych tkanek zwierząt nawet bardzo odległych gatunków [2, 21]. Omawiane izoformy aktyny są produktami odrębnych genów o znacznej homologii sekwencji nukleotydowych, a występujących w wielu, często nie ulegających ekspresji kopiach [1, 13, 22]. Cytoplazmatyczne aktyny z komórek niemięśniowych są w około 93% identyczne z aktynami mięśniowymi (różnice dotyczą około 25 aminokwasów), między sobą zaś różnią się podstawieniami czterech jedynie aminokwasów o podobnym charakterze w obrębie końca N cząsteczki. Różnice sekwencji poszczególnych aktyn mięśniowych dotyczą zaledwie 3 do 6 zastąpień aminokwasowych [12-16, 23]. Cechą charakterystyczną wszystkich izoaktyń jest zacetylowanie „kwaśnego” końca N [1, 23]. Modyfikowanie tego fragmentu cząsteczki aktyny następuje

drożdży ma obniżoną zdolność polimeryzacji [1].

W ostatnich latach do izoform aktynowych zaliczono też tzw. białka aktynopodobne („*actin related proteins*”), których obecność wykryto w komórkach kręgowców, drożdży (*Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*) oraz w organizmie prokariotycznym — *Spirulina platensis* [24, 25]. Białka te cechuje bardziej zasadowy niż innych aktyn punkt izoelektryczny, którego wartości wahają się w granicach pH 6,6-6,8, co wynika z różnic w składzie i sekwencji aminokwasów w łańcuchu polipeptydowym (35-47% identyczności z aktyną mięśniową). Białka aktynopodobne posiadają dodatkowe reszty aminokwasowe w obszarach pomiędzy aminokwasami 39-49 oraz 91-103 w łańcuchu polipeptydowym (insereja). Zawierają jednak w swojej strukturze rejon odpowiadający za wiązanie cząsteczki ATP, tak jak ma to miejsce w cząsteczce aktyny. Pozwoliło to na określenie ich mianem „aktynopodobnych” [25].

Pytanie, czy białka te pełnią w komórce funkcje podobne jak aktyna, pozostaje dotąd bez odpowiedzi. Wykazano jedynie, że występująca w komórkach kręgowców centraktyna („*centractin*”) łączy się z centrosomami [26]. Podobną zdolność wykazuje zaliczane do tej grupy białko określane jako aktyna-RPV („*actin related proteins vertebrates*”), stanowiące główną składową kompleksu z dyneiną, obecnego w mózgu kręgowców [27]. Na podstawie

dotychczasowych badań stwierdza się, że białka aktynowopodobne mogą uczestniczyć w „zakotwiczeniu” centrosomów, jak również w ruchu wewnątrzkomórkowym [25].

III. Zróznicowanie funkcji izoaktyń cytoplazmatycznych

Szereg danych wskazuje, że izoaktyń β i γ występują w różnych obszarach cytoplazmy, co może oznaczać zróznicowanie ich funkcji [28-31]. Do rozwiązania problemów dotyczących miejsca działania aktyń w komórce stosuje się m.in.: przeciwciała monoklonalne, rozpoznające poszczególne izoformy aktyń, wymianę genów aktynowych, analizę ewentualnych mutacji w tych genach oraz lokalizację mRNA aktyń cytoplazmatycznych [22, 28, 29, 31, 32].

Korelację pomiędzy wzrostem poziomu cytoplazmatycznej aktyńy i procesem różnicowania komórki zaobserwowano już w latach 80-tych [33]. Limfocyty mieloblastycznej białaczki mysiej charakteryzuje wysoki stosunek izoformy $\beta:\gamma$ (7,6), co czyni izoaktyńę γ niewykrywalną przy pomocy powszechnie stosowanej do tego celu techniki ogniskowania izoelektrycznego. Aktyńy γ nie wykryto również w ludzkich białaczkowych limfocytach [34] i transformowanych fibroblastach mysich [35]. Komórki białaczki mysiej potraktowane czynnikiem wzrostowym przekształcają się w dojrzałe, zdolne do ruchu makrofagi, czemu towarzyszy dwukrotny wzrost zawartości aktyńy [33].

Odrębność funkcji izoform aktyńy wspierają dane o tkankowo-specyficjnej ich ekspresji, ulegającej zmianie w procesie różnicowania [28, 32]. Wykazano, że w tkankach embrjonalnych szczura, bez względu na rodzaj tkanki dominują izoformy cytoplazmatyczne β i γ [32]. Nie wiadomo też, jaka jest przyczyna zróznicowania poziomu tych izoform w komórkach mięśniowych ssaków. Stosunek zawartości izoform $\beta:\gamma$ określony w różnych tkankach szczura waha się od wartości 1:1 (w jądrach), 2,5:1 (w wątrobie) do 6:1 (w aorcie) [12, 36], podczas gdy analiza ilościowa mRNA kodującego zarówno aktyńę β jak i γ w różnych narządach myszy wskazuje na odmienne molowe proporcje transkryptów tych izoform ($\beta:\gamma$) [28]. Przyjmują one wartości od 1,7 w nerwie i jądrach do 13 w sercu i 114 (!) w wątrobie. Porównanie danych nasuwa pytanie o przyczynę tak znacznych rozbieżności pomiędzy poziomem transkryptów poszczególnych izoaktyń, a poziomem syntetyzowanych na ich podstawie białek u tak bli-

ska spokrewnionych gatunków zwierząt jak szczur i mysz. Rozważa się możliwość istnienia w komórce niezależnych mechanizmów regulacji ekspresji izoform β i γ na poziomie transkrypcji i translacji [23, 28].

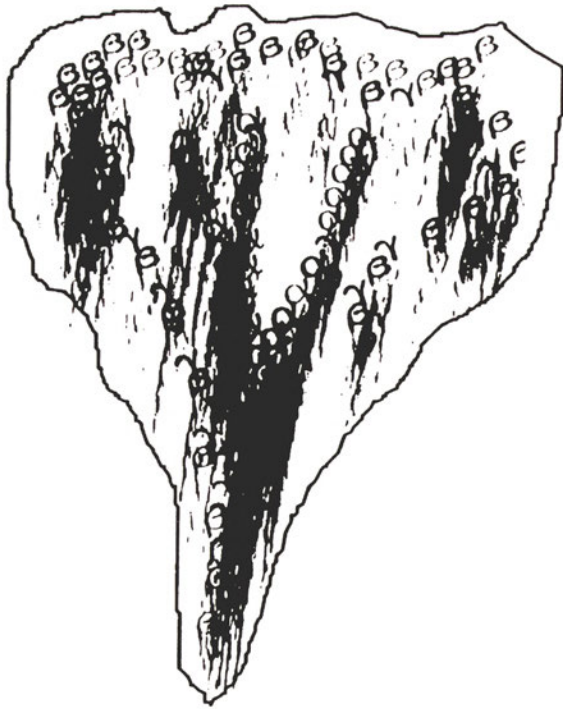
W poszukiwaniu odpowiedzi na pytanie, czy izoaktyńy cytoplazmatyczne pełnią w komórce odrębne funkcje, badano ich subkomórkową lokalizację równoległą z lokalizacją kodującego je mRNA. Stwierdzono różnice w rozmieszczeniu transkryptów obu tych aktyń w mioblastach [29]. W obszarze cytoplazmy otaczającej jądro wykryto mRNA aktyńy γ , zaś mRNA aktyńy β występuje zarówno w tym rejonie, jak i na „peryferiach” komórki. Lokalizacja transkryptów nie pokrywa się jednak z lokalizacją obu aktyń w mioblastach. Aktyńa β znajduje się wprawdzie na obrzeżach komórki, jednakże forma γ występuje zarówno podbłonowo, jak i w wiązках aktynowych [30, 31].

Gromadzenie izoaktyńy β i transkryptu tego białka w peryferyjnej części cytoplazmy zaobserwowano w komórkach epithelialnych naczyń włosowatych hodowanych *in vitro* w odpowiedzi na ich uszkodzenie mechaniczne. W warunkach *in vivo*, rozzerwaniu ściany naczynia towarzyszy chwilowa, wzmożona ekspresja aktyńy niemięśniowych w miejscach form dominujących, typowych dla mięśni gładkich [37, 38].

Dowodem potwierdzającym zróznicowanie funkcjonalne izoaktyń cytoplazmatycznych jest fakt, że transfekcja mysich mioblastów ludzkimi genami kodującymi aktyńę β lub γ , powoduje zmiany morfologii badanych komórek w zależności od zastosowanego do doświadczeń genu [22]. Komórki syntetyzujące ludzką aktyńę β mają tendencję do zwiększania swojej powierzchni i utraty włókien naprężeniowych („*stress fibers*”), podczas gdy mioblasty syntetyzujące izoformę γ odznaczają się zakrąglonym kształtem. Wyniki te wskazują na to, że rodzaj syntetyzowanych izoform aktyńy wpływa na morfologię komórki [22, 39].

W oparciu o dane uzyskane przy zastosowaniu technik immunologicznych oraz wymiany genów aktynowych, przedstawiono model rozmieszczenia izoaktyń w komórce zdolnej do ekspresji mięśniowych i niemięśniowych izoform aktyńy (Ryc. 1) [25].

Obserwacje przedstawione w tym rozdziale wskazują na zróznicowanie funkcji izoaktyń cytoplazmatycznych. Izofорма β , zlokalizowana na peryferiach komórki odpowiada za jej zdolność do ruchu — tworzenie lamelli i pseudopodiów oraz naprawę uszko-



Ryc. 1. Schemat rozmieszczenia izoakty w komórce zdolnej do ekspresji niemięśniowych i mięśniowych izoform aktyny wg Herman [25] (zmodyfikowano).

dzeń. Aktynie γ przypisuje się natomiast rolę w utrzymaniu architektury mikrofilamentów i w procesach różnicowania komórki [25].

IV. Aktyna w stanach patologicznych komórek

Wielu procesom chorobowym towarzyszą zmiany w obrębie mikrofilamentów aktynowych. Obserwowano je między innymi badając: transformację nowotworową wraz z procesem metastazy [11, 40-42], choroby przebiegające z procesem włóknienia [43-47], chorobę Hirschsprunga [48], anemię sierpowatą [49], czy też bliznowacenie ran [11].

IV-1. Architektura cytoszkieletu aktynowego w komórkach nowotworowych

Rozwój technik immunofluorescencyjnych oraz mikroskopii elektronowej pozwolił na obserwację zmian w obrębie szkieletu komórkowego, towarzyszących pojawieniu się nowotworowego fenotypu komórki. Badania obejmują głównie różne linie komórek transformowanych *in vitro*, co stwarza możliwość porównania zmian morfologii i organizacji cytoszkieletu w stosunku do komórek normalnych.

Komórki transformowane wirusem, chemicznie, czy też spontanicznie cechuje zmiana organizacji mikrofilamentów aktyny, np. obecność agregatów F-aktyny w postaci „łatek” czy „rozetek”. Natężenie i lokalizacja zmian uzależnione są od rodzaju komórek i typu transformacji [40-42, 50, 51]. Deorganizacja

architektury mikrofilamentów aktynowych niejednokrotnie związana jest ze wzrostem inwazyjności komórek rakowych [18, 52].

Obserwacje mikroskopowe uzupełniane są badaniami biochemicznymi, mającymi na celu m.in. określenie zmian poziomu aktyny i stopnia jej spolimeryzowania w cytoplazmie transformowanych komórek. Ocena ilości aktyny monomerycznej (aktyny G) i filamentarnej (aktyny F) w komórce następuje z wieloma trudnościami ze względu na znaczną dynamikę procesu polimeryzacji aktyny. Zainteresowani wyznaczeniem tych parametrów posługują się różnymi technikami m.in. testem, w którym wykorzystuje się zdolność aktyny do hamowania aktywności DNazy I z trzustki wołu [18, 21, 53-57], czy też pomiarem fluorescencji znakowanej aktyny w cytometrze przepływowym [58]. Uzyskane tą drogą wyniki nie są jednoznaczne. Z eksperymentów przeprowadzonych na transformowanych ludzkich keratynocytach [50], fibroblastach [18], komórkach szczurzego czerniaka Walkera 256 [54] oraz mieloblastycznej mysiej białaczki [59] wynika, że w transformowanych komórkach poziom całkowitej aktyny ulega redukcji, czemu towarzyszy obniżony stopień jej spolimeryzowania wyrażony stosunkiem F:G [54, 55, 59]. Do końca nie wiadomo, co leży u podstaw tego zjawiska. Może to być m.in. wynikiem obniżenia poziomu aktyny monomerycznej poniżej stężenia krytycznego dla polimeryzacji [18], co prowadzi do rozpadu mikrofilamentów. Deorganizacja architektury filamentów aktyny może być również skutkiem działania białkowych produktów onkogenów np.

pp60^{src}, czy też zaburzenia w oddziaływaniu aktywności z białkami regulującymi jej polimeryzację [4, 21, 41].

W odróżnieniu od cytowanych wyżej wyników, wskazujących na redukcję zawartości aktywności w różnych komórkach nowotworowych, nasze własne doświadczenia wskazują na to, że procesowi wzrostu nowotworu eksperymentalnego *hepatoma Morris* 5123 towarzyszy znaczne podwyższenie zawartości aktywności, z maksimum przypadającym na okres tworzenia pierwszych przerzutów nowotworu do płuc [56, 57]. Podwyższony poziom aktywności filamentarnej stwierdzono również w komórkach mysiego chłoniaka BW5147 o zwiększonej inwazyjności [58]. Przypuszcza się, że wysoki poziom aktywności i wzrost stopnia jej spolimeryzowania w komórce nowotworowej jest niezbędny do ameboidalnego ruchu tych komórek i tworzenia pseudopodiów podczas inwazji nowotworu do otaczających tkanek w procesie metastazy [60]. Rodzi się też pytanie, czy zastosowanie czynników regulujących polimeryzację aktywności w charakterze leków mogłoby stanowić nowy kierunek terapeutyczny w leczeniu nowotworów [58].

IV-2. Zmiany ekspresji izoform aktywności w nowotworach

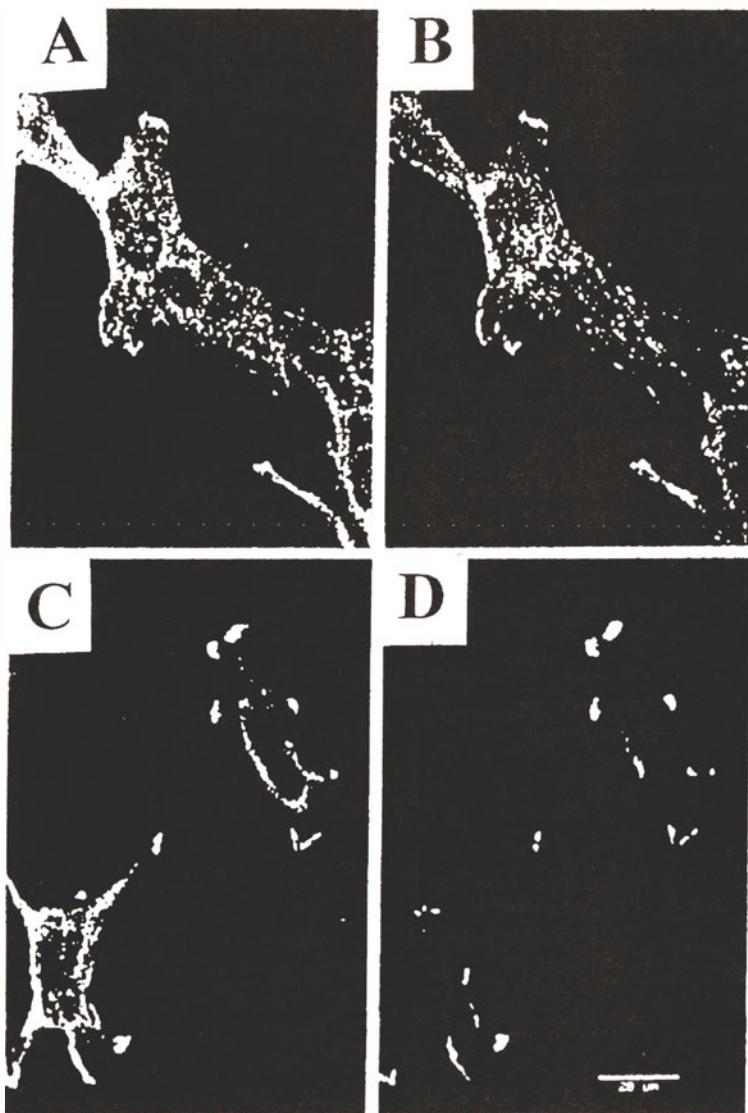
Wiele danych wskazuje na to, że u podstaw reorganizacji filamentów aktynowych w komórkach nowotworowych leżą zmiany w ekspresji poszczególnych izoform aktywności [35, 45, 61-68]. Stwierdzono, że wzrost ekspresji aktywności cytoplazmatycznych towarzyszy indukowanemu chemicznie nowotworowi skóry, wątroby, węzłów chłonnych oraz nerek [69], jak również ludzkim nowotworom piersi i skóry [45]. Poszukuje się związku tych zmian ze wzrostem inwazyjności komórek nowotworowych. Uzyskiwane dane są często niejednoznaczne. Limfocyty T syntetyzują aktywność β w znacznym nadmiarze w stosunku do aktywności γ , podczas gdy ich leukemiczne odpowiedniki zawierają obydwie formy w równych proporcjach [35]. Dla kontrastu, komórki białaczki mieloblastycznej M1 zawierają przede wszystkim izoformę β i dopiero po indukcji procesów różnicowania tych komórek stwierdza się wzrost zawartości całkowitej aktywności i wzmożoną syntezę aktywności γ [33, 59], o czym była mowa w rozdziale III niniejszego artykułu. Na szczególną uwagę zasługują opublikowane ostatnio wyniki badań inwazyjnych i nieinwazyjnych komórek różnych nowotworów [70, 71]. W komórkach inwazyjnych linii mięsaka zawartość aktywności β jest znacznie większa w porównaniu z jej zawartością w komórkach nieinwazyjnych. Wzrostowi po-

ziomu aktywności β towarzyszy również zmiana jej rozmieszczenia w komórce i zagęszczenie w szczytowych partiach tworzących się pseudopodiów, tj. w obszarach odznaczających się znaczną dynamiką polimeryzacji aktywności (Ryc. 2) [70]. Inwazyjne komórki ludzkiego raka ślinianek charakteryzuje natomiast obniżony poziom aktywności γ , towarzyszący dezorganizacji mikrofilamentów aktywności i wzrostowi zdolności metastatycznych tych komórek w porównaniu z komórkami nieinwazyjnymi [71].

Zainteresowania wielu laboratoriów dotyczą ekspresji aktywności z mięśni gładkich (α SMA) w różnych nowotworach [45, 61-64, 68, 72]. Wynikiem tego są często sprzeczne dane o obniżonej, bądź też wzmożonej syntezie tej izoaktywności w komórkach nowotworowych. Fibroblasty transformowane wirusem mięsaka Rousa, prezentujące zmieniony, „porozrywany” układ mikrofilamentów aktynowych, cechuje obniżona synteza α SMA [68]. Znany jest jednak szereg przykładów, w których wzmożonej ekspresji α SMA towarzyszy zmiana fenotypu komórki na nowotworowy. Taki stan obserwuje się w komórkach zrębu szyjki macicy [62], w ludzkich nowotworach skóry, piersi, płuc i węzłów chłonnych [39, 73] oraz w chemicznie indukowanym nowotworze wątroby szczura [74]. W tym ostatnim przypadku [74] stwierdzono podwyższoną ekspresję tej izoformy jeszcze w stadium przednowotworowym, co może mieć znaczenie diagnostyczne we wczesnym wykrywaniu tego schorzenia. Badania α SMA w hepatokarcynogenezie wykazały wzmożoną ekspresję tej izoaktywności w otaczających nowotwór komórkach zrębu wątroby [44, 61], uczestniczących w procesie nekrozy guza oraz włóknienia tkanki wątrobowej [44]. Zmniejszenie ekspresji α SMA w ścianach naczyń krwionośnych jajnika ludzkiego natomiast towarzyszy rozwojowi wyłącznie złośliwej postaci nowotworu [63, 64].

Pomimo, iż opublikowane dane wskazują bądź na wzrost, bądź na obniżenie syntezy α SMA w różnego typu nowotworach, obserwujemy ugruntowanie się poglądu, że izoforma ta może w przyszłości stanowić użyteczny marker w diagnostyce i monitorowaniu chorób nowotworowych [39, 62, 73, 74]. Podobny pogląd wyrażono ostatnio również w stosunku do aktywności γ z mięśni gładkich (γ SMA). Stwierdzono bowiem brak ekspresji tego białka w nowotworach mięśni gładkich [75].

Odrębny aspekt badań nad ekspresją izoaktywności stanowi obecność zmutowanych form aktywności w komórkach transformowanych. Pierwsze informacje na ten temat sięgają początków lat 80-tych. Stwierdzono wówczas obecność dodatkowej izoaktywności ζ w ko-



Ryc. 2. Lokalizacja cytoplazmatycznych izoaktyn w epitelialnych komórkach MDCK, transformowanych MSV (*Moloney sarcoma virus*) [70] (zmodyfikowano). A, B — komórki nieinwazyjne, C, D — inwazyjne; A, C — reakcja ze znakowanymi fluorescencyjnie przeciwciałami rozpoznającymi aktynę γ ; B, D — reakcja ze znakowanymi fluorescencyjnie przeciwciałami skierowanymi przeciwko aktynie β ; obraz uzyskany w mikroskopie konfokalnym.

mórkach mięsaka 180 [76] i zmutowaną aktynę β (β_m) w chemicznie transformowanych ludzkich fibroblastach HUT-14 [35, 65, 66]. Aktyna β_m występuje w nowotworowych fibroblastach w ilościach odpowiadających poziomowi izoform β i γ w fibroblastach normalnych. Jej punkt izoelektryczny jest przesunięty w kierunku kwaśnym, a masa cząsteczkowa nieco wyższa w porównaniu do wartości wyznaczonych dla cytoplazmatycznej aktyny β . Udowodniono również, że powstanie tego białka jest wynikiem somatycznej mutacji w jednym z genów aktynowych, wynikającej z zastąpienia reszty glicyny arginina w pozycji 244 aminokwasu w łańcuchu polipeptydowym. Wiadomo również, że podwyższona synteza tej izoformy, wywołana poprzez transfekcję fibroblastów genem aktyny β_m , powoduje zakłócenie prawidłowego „utkania” mikrofilamentów, czemu towarzyszy jednoczesny wzrost właściwości metastatycznych transformowanych fibroblastów. Działanie genu kodującego zmutowaną aktynę β_m wydaje się być sprzężone z ekspresją onkogenów *myc* i *ras* [66].

Obecność zmutowanej formy aktyny β stwierdzono również w komórkach mysiego czerniaka B16 [67, 77, 78]. Stosując technikę elektroforezy dwukierunkowej pokazano, że białko to współlistnieje z izoformami β i γ . Analiza porównawcza cDNA mutanta oraz cDNA aktyny β wykazała, że w DNA mutanta nukleotyd kodujący argininę został zastąpiony przez nukleotyd kodujący izoleucynę w pozycji 28 powstającego polipeptydu [78]. Transfekcja genem zmutowanej aktyny komórek czerniaka o wysokiej inwazyjności — powoduje redukcję możliwości metastatycznych tych komórek [67].

IV-3. Izoformy aktyny w innych procesach chorobowych

Zmienioną ekspresję izoform aktyny obserwuje się w komórkach przyrannych w stanach nieprawidłowego gojenia się ran, prowadzących do przetrwania blizn oraz w zwłóknieniu (*fibrosis*) w niektórych narządach, takich jak wątroba czy płuca [11, 43, 44, 46, 47, 79]. W trakcie prawidłowego zablizniania ran

fibroblasty przekształcają się w miofibroblasty, czemu towarzyszy „czasowa” ekspresja aktyny α , typowej dla komórek mięśni gładkich (α SMA). Aktyna uczestniczy w kureczeniu się tkanki ziarninowej w gojącej się ranie. Utrzymanie ciągłej ekspresji tej izoaktyny prowadzi do bliznowacenia ran lub innych chorób, jak np. marskość wątroby [11, 43, 46].

Poziom syntezy α SMA w fibroblastach jest kontrolowany przez niektóre składniki macierzy zewnątrzkomórkowej (heparyna) oraz cytokiny (interferon γ i TGF β_1 — „transforming growth factor β_1 ”). TGF β_1 stymuluje ekspresję aktyny α w miofibroblastach i umożliwia tym samym zabliznianie, natomiast działanie interferonu γ wywołuje efekt przeciwny [80]. Podawanie interferonu γ pacjentom cierpiącym na przerost blizn oraz chorobę Dupuytre-na redukuje poziom α SMA w komórkach, a tym samym ogranicza obszar uszkodzenia [81].

Wydaje się więc, że α SMA może służyć jako marker nie tylko zmian nowotworowych, lecz również w schorzeniach związanych z procesem włóknienia, na przykład w chorobach wątroby takich jak marskość, chroniczne zapalenie, czy też nowotwory wątroby [43-45]. W zdrowej wątrobie, komórki Ito uczestniczą w magazynowaniu witaminy A oraz w produkcji składowych macierzy zewnątrzkomórkowej. W stanach patologicznych, przebiegających z procesem włóknienia, komórki te proliferują, nabierając morfologicznych cech miofibroblastów, co jednocześnie wiąże się ze wzrostem ilości filamentów aktyny oraz poziomu α SMA w odpowiedzi na postępujący proces zwłóknienia w wątrobie [43, 44].

Wzrost ekspresji α SMA obserwowano również podczas indukowanego bleomycyną włóknienia śródmiąższowych pęcherzyków płucnych szczura [79, 47]. Analogiczna sytuacja może mieć miejsce w przypadku chronicznej, bakteryjnej infekcji płuc i podczas zatrucia wywołanego wdychaniem związków toksycznych.

Ekspresja α SMA ulega zmianie u pacjentów cierpiących na chorobę Hirschsprunga [48], polegającej na zaburzeniach perystaltyki jelit oraz niedrożności jelita grubego. Badania immunohistochemiczne mięśni gładkich jelit pacjentów nie wykazują obecności α SMA — jednego z najistotniejszych składników aparatu kurczliwego mięśni gładkich.

Wzrost syntezy mRNA aktyny β towarzyszy doświadczalnemu uszkodzeniu lewej komory serca u psów [82], które powoduje jej przerost. Podwyższenie ilości mRNA nie jest jednak skorelowane z identycznym wzrostem poziomu izoformy β . Wydaje się, że pojawiający się transkrypt nie ulega translacji, albo też jest on zmienioną formą aktyny β , której nie

rozpoznano przy zastosowaniu standardowych przeciwciał skierowanych przeciwko izoaktynie β . Monitorowanie ekspresji genu aktyny β może więc służyć za niespecyficzny marker uszkodzenia komór serca [82].

Posttranslacyjna modyfikacja aktyny β , polegająca na utworzeniu mostka dwusiarczkowego pomiędzy Cys²⁸⁴ a Cys³⁷³ w łańcuchu polipeptydowym cząsteczki, towarzyszy zmianie kształtu erytrocytów w anemii sierpowatej [49]. Fakt ten, zdaniem autorów [49], może w przyszłości wyznaczyć kierunek leczenia anemii sierpowatej.

V. Podsumowanie

Oceniając wyniki badań, zmierzających do ustalenia celowości istnienia w komórce wielu izoform aktyny wydaje się, że odpowiedź na to pytanie pozostaje nadal sprawą otwartą. Nie mniej jednak wiele danych pochodzących z różnych laboratoriów, wskazuje na zróżnicowanie lokalizacji i funkcji aktyny w komórce oraz zmiany ekspresji izoform aktyny w różnych stanach patologicznych m.in. w chorobach nowotworowych.

Jednymi z najbardziej interesujących są doniesienia o możliwości wykorzystania zmienionej ekspresji izoformy aktyny α z mięśni gładkich (α SMA), jako markera towarzyszącego pojawianiu się różnych chorób. Wykazano, że ekspresja tej izoformy ulega zmianie w nowotworowych komórkach jajnika, szyjki macicy, skóry, piersi, płuc, węzłów chłonnych i wątroby oraz podczas włóknienia tkanek, prowadzącego do przerostu blizn, marskości i przewlekłego wirusowego zapalenia wątroby. Na szczególną uwagę zasługują też spostrzeżenia, wskazujące na wzrost ekspresji izoformy β i jej peryferyjnej lokalizacji w szczytowych partiach pseudopodiów w inwazyjnych komórkach nowotworowych.

W świetle powyższych informacji, z uwagi na wielofunkcyjność aktyny i jej znaczenie w życiu komórki, badania zmian ilościowych i jakościowych tego białka w materiale patologicznym winny być kontynuowane. Kluczowa rola aktyny w morfologii komórki i jej zdolności do ruchu czyni je istotnymi na drodze do zrozumienia molekularnego mechanizmu wielu chorób, a szczególnie procesu wzrostu nowotworów, wczesnego ich wykrywania i zdolności do tworzenia przerzutów.

Podziękowania

Autorzy dziękują za grant KBN nr 0087/P2/94/07

Piśmiennictwo

1. Sheterline P, Clayton J, Sparrow JC (1995) *Protein Profile-Actin*, Academic Press Ltd, London
2. Kabsch W, Vandekerckhove J (1992) *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **21**: 49-76
3. Grolig F (1990) *Protoplasma* **155**:29-42
4. Kuznetzow SA, Rivera DT, Severin FF, Weiss DG, Langford GM (1994) *Cell Motility Cytoskel* **28**: 231-242
5. Trifaro JM, Vitale ML (1993) *TINS* **16**: 466-472
6. Melamed I, Downey GP, Aktories K, Roifman CM (1991) *J Immun* **147**: 1139-1146
7. Stoszel TP (1989) *J Biol Chem* **264**: 18261-18264
8. Pollard TD, Cooper JA (1986) *Annu Rev Biochem* **55**: 987-1036
9. Carlier MF (1998) *Curr Opin Cell Biol* **10**: 45-51
10. Bremer A, Aebi U (1992) *Curr Opin Cell Biol* **4**: 20-26
11. Janmey PA, Chaponnier C (1995) *Curr Opin Cell Biol* **7**: 111-117
12. Vandekerckhove J, Weber K (1978) *Eur J Biochem* **90**: 451-462
13. Vandekerckhove J, Weber K (1978) *J Mol Biol* **126**: 783-802
14. Vandekerckhove J, Weber K (1978) *Proc Natl Acad Sci* **75**: 1106-1110
15. Vandekerckhove J, Weber K (1979) *Differentiation* **14**: 123-133
16. Vandekerckhove J (1987) *International Meeting Actin '87*: 89-98
17. Garrels JI, Gibson W (1976) *Cell* **9**: 793-805
18. Gowling LR, Tellam RL, Banyard MRC (1984) *J Cell Sci* **69**: 137-146
19. Jaberg B (1983) *Z. Naturforsch.* **38c**: 829-833
20. Sawtell NM, Lessard JL (1989) *J Cell Biol* **109**: 2929-2937
21. Malicka-Błaszczkiewicz (1988) Aktyna i DNaza w komórkach eukariotów *Acta Universitatis Wratislaviensis No 1048*, Wydawnictwo Uniwersytetu Wrocławskiego
22. Schevzov G, Lloyd C, Gunning P (1992) *J Cell Biol* **117**: 775-785
23. Rubenstein PA (1990) *Bioassays* **12**: 309-315
24. Clark CM, Goodlad GAJ (1985) *Biochim Biophys Acta* **820**: 27-32
25. Herman, IM (1993) *Curr Opin Cell Biol* **5**: 48-55
26. Clark SW, Meyer DI (1992) *Nature* **359**: 246-250
27. Piperno G, Mead K, Shestak W (1992) *J Cell Biol* **118**: 1455-1463
28. Erba HP, Eddy R, Shows T, Kedes L, Gunning P (1988) *Mol Cell Biol* **8**: 1775-1789
29. Hill MA, Gunning P (1993) *J Cell Biol* **122**: 825-832
30. McKenna N, Meigs NJ, Wang YL (1985) *J Cell Biol* **100**: 292-296
31. Otey AC, Kalnoski MH, Lessard JL, Bulinski JC (1986) *J Cell Biol* **102**: 1726-1737
32. McHugh KM, Crawford K, Lessard JL (1991) *Develop Biol* **148**: 442-458
33. Nagata K, Ichikawa Y (1984) *Cell Muscle Motil* **5**: 171-193
34. Leavitt J, Leavitt A, Atallah AM (1980) *J Biol Chem* **255**: 4984-4987
35. Sakiyama S, Fujimura S, Sakiyama H (1980) *J Biol Chem* **256**: 31-33
36. Otey AC, Kalnoski MH, Bulinski JC (1987) *J Cell Biochem* **34**: 113-124
37. Hoock TC, Newcomb PM, Herman IM (1991) *J Cell Biol* **112**: 653-664
38. Gabbiani G, Kocher O, Bloom WS, Vandekerckhove J, Weber K (1984) *J Clin Invest* **73**: 148-152
39. Dugina V, Alexandrova A, Chaponnier C, Vasiliev J, Gabbiani G (1998) *Exp Cell Res* **238**: 481-490
40. Ben-Ze'ev A (1985) *Biochim Biophys Acta* **780**: 197-212.
41. Bershadsky AD, Vasiliev JM (1989) *Cytoskeleton* 267-281, Plenum Press, New York
42. Carley WW, Barak LS, Webb WW (1981) *J Cell Biol* **90**: 797-802
43. Enzan H, Himeno H, Iwamura S, Saibara T, Onishi S, Yamamoto Y, Hara H (1994) *Virchows Archiv* **424**: 249-256
44. Enzan H, Iwamura S, Himeno H, Saibara T, Onishi S, Yamamoto Y, Hara H (1995) *Kupffer Cell Foundation* **5**: 422-423
45. Gabbiani G, Trenchev P, Holborow EJ (1975) *Lancet* **2**: 796-797
46. Schmitt-Gräff S, Krüger S, Bochar F, Gabbiani G, Denk H (1991) *Am J Pathol* **138**: 1233-1242
47. Vyalov SL, Gabbiani G, Kapanci Y (1993) *Am J Pathol* **143**: 1754-1765
48. Fromont-Hankard G, Lafer D, Masood S (1996) *Arch Pathol Lab Med* **120**: 270-274
49. Benesath FA, Shartawa A, Monteiro CA, Goodman SR (1996) *Biochemistry* **35**: 4403-4408
50. Katsatonis J, Tosca A, Koukouritaki SB, Theodoropoulos PA, Gravanis A, Stournaras C (1994) *Cell Biochem Funct* **12**: 267-274
51. Pokorna E, Jordan PW, O'Neill CH, Zicha D, Gilbert CS, Vesely P (1994) *Cell Motility Cytoskel* **28**: 25-33
52. Friedman E, Verderame M, Vinawer S, Pollack R (1984) *Cancer Res* **44**: 3040-3050
53. Blikstad I, Markey F, Carlsson L, Persson T, Lindberg U (1978) *Cell* **15**: 935-943
54. Clark CM, Goodlad GAJ (1985) *Biochim Biophys Acta* **820**: 27-32
55. Malicka-Błaszczkiewicz M, Roth JS (1981) *Biochem Biophys Res Commun* **102**: 594-601
56. Malicka-Błaszczkiewicz M, Styczeń I, Nowak D, Hańczycowa H, Ponikowski P, Sebzda T (1995) *Mat Med Pol* **27**: 115-118
57. Nowak D, Majcher I, Kochman A, Malicka-Błaszczkiewicz M (1995) *J Exp Clin Cancer Res* **14**: 37-40
58. Verschueren H, Van Der Taelen I, Dewit J, De Braekeleer J, De Baetselier P (1994) *J Leukocyte Biol* **55**: 552-556
59. Nagata K, Sagara J, Ichikawa Y (1980) *J Cell Biol* **85**: 273-282
60. Jones GJ, Segall J, Condeelis J (1991) W: ID Goldberg (red) *Cell Motility Factors*. Birkhäuser Verlag Basel, Switzerland
61. Bunton E (1995) *Carcinogenesis* **16**: 1059-1063
62. Cintorino M, Bellizzi de Marco, Leoncini P, Tripodi A, Ramaeckers C, Sappino P, Schmitt-Gräff A, Gabbiani G (1991) *Int J Cancer* **47**: 843-846
63. Czernobilsky B, Shezen E, Lifschitz-Mercer B, Fogel M, Luzon A, Jacob N, Skalli O, Gabbiani G (1989) *Virchows Archiv B Cell Pathol* **57**: 55-61
64. Kobayashi MD, Tsuruchi N, Sugihara K, Kaku T, Saito T, Kamura T, Tsukamoto N, Nakano H, Taniguchi S (1993) *Gynecol Oncol* **48**: 308-313
65. Leavitt J, Kakunaga T (1980) *J Biol Chem* **255**: 1650-1661
66. Leavitt J (1994) *Electrophoresis* **15**: 345-357
67. Shimokawa-Kuruoki R, Sadano H, Taniguchi S (1994) *Int J Cancer* **56**: 689-697
68. Witt DP, Brown DJ, Gordon JA (1983) *J Cell Biol* **96**: 1766-1771
69. Toh BH, Qvist R, Randell VB, Elrick WL (1977) *Cancer Res* **37**: 4280-4284
70. Le PU, Nguyen TN, Drolet-Savoie P., Leclerc N, Nabi I (1998) *Cancer Res* **58**: 1631-1635
71. Suzuki H, Nagata H, Shimada Y, Konno A (1998) *Int J Oncol* **12**: 1079-1084

72. Goodlad GAJ, Clark CM (1993) *Bioch Biophys Acta* **1145**: 177-179
73. Matthews TJ, Hornall D, Shephard MN (1992) *J Clin Pathol* **46**: 479-480
74. Toh BH, Cauchi MN, Cook PC, Muller HK (1977) *Br J Cancer* **35**: 761-767
75. Brittingham J, Liaw D, Liddell R, McHugh M., McCue P., McHugh KM (1997) *Pathobiology* **65**: 113-122
76. Bravo R, Fey SJ, Small JV, Larsen PM, Celis JE (1981) *Cell* **25**: 195-202
77. Taniguchi S, Kawano T, Kakunaga T, Baba T (1986) *J Biol Chem* **261**: 6100-6106
- Taniguchi S, Sadano H (1992) *Pigment Cell Res Suppl* **2**: 185-190
79. Mitchell J, Woodcock-Mitchell J, Reynolds S, Low R, Leslie K, Adler K, Gabbiani J, Skalli O (1989) *Lab Invest* **60**: 643-649
80. Desmouliere A, Gabbiani G (1994) *Cell Motility Cytoskel* **29**:195-203
81. Pittet B, Rubbia-Brandt L, Desmouliere A, Sappino A, Roggero P, Guerret S, Grimaud J, Montandon D, Gabbiani G (1994) *Plast Reconstr Surg* **93**: 1224-1235
82. Carlyle WC, Toher CA, Vandervelde JR, McDonald KM, Homans DC, Cohn JN (1996) *J Mol Cell Cardiol* **28**: 53-63

Transport białek i RNA pomiędzy jądrem komórkowym a cytoplazmą

Transport of proteins and RNAs between the nucleus and the cytoplasm

MACIEJ KMIĘCIAK¹, ZOFIA SZWEYKOWSKA-KULIŃSKA,²
ARTUR JARMOŁOWSKI³

Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Jądro komórkowe. Pory jądrowe
- III. Import
 - III-1. Sygnał lokalizacji jądrowej
 - III-2. Import białek o klasycznym sygnale lokalizacji jądrowej
 - III-3. Import białek nie posiadających klasycznego sygnału lokalizacji jądrowej
 - III-3.1. Transportyna – receptor importu białka A1 hnRNP
 - III-3.2. Receptory importu białek rybosomowych
 - III-3.3. Białka uczestniczące w imporcie snRNP
- IV. Eksport
 - IV-1. Sygnał eksportu z jądra komórkowego do cytoplazmy
 - IV-1.1. Elementy cząsteczek RNA ważne dla ich transportu z jądra komórkowego do cytoplazmy. Retencja jądrowa
 - IV-1.2. Białka adaptorowe. Sygnały eksportu z jądra komórkowego do cytoplazmy (NES)
 - IV-1.3. Receptory eksportu – eksportyny
- V. Regulacja importu i eksportu
- VI. Uwagi końcowe

Wykaz stosowanych skrótów: BSA — albumina surowicy wołu (ang. *bovine serum albumin*); snRNA — jądrowy niskocząsteczkowy RNA; NLS — sygnał lokalizacji jądrowej (ang. *nuclear localization signal*); NES — sygnał eksportu z jądra komórkowego (ang. *nuclear export signal*); m⁷G — 7-metyloguanozyna; m^{2,2,7}G — 2,2,7-trimetyloguanozyna; NPC — por jądrowy (ang. *nuclear pore complex*); CBC — kompleks białek wiążących się do czapeczki (ang. *cap binding complex*); NRS — sygnał retencji jądrowej (ang. *nuclear retention signal*); RRE — element sekwencji RNA rozpoznawany przez białko Rev wirusa HIV (ang. *Rev response element*).

¹Mgr., ²dr hab., ³dr hab., Zakład Ekspresji Genów, Instytut Biologii Molekularnej i Biotechnologii, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu, ul. Międzychodzka 5, 60-371 Poznań

Contents:

- I. Introduction
- II. The nucleus. Nuclear pore complexes
- III. Import
 - III-1. The nuclear localization signal
 - III-2. Import of proteins with the classical nuclear localization signals
 - III-3. Import of proteins without classical nuclear localization signals
 - III-3.1. Transportin – the import receptor for hnRNP A1
 - III-3.2. Import receptors for ribosomal proteins
 - III-3.3. Proteins that participate in import of snRNPs
- IV. Export
 - IV-1. The nuclear export signal
 - IV-1.1. RNA elements important for transport of RNA from the nucleus to the cytoplasm. Nuclear retention
 - IV-1.2. Adaptor proteins. The nuclear export signals (NES)
 - IV-1.3. Export receptors – the exportins
- V. Regulation of import and export
- VI. Concluding remarks

I. Wstęp

Cechą charakterystyczną komórki eukariotycznej jest obecność wyodrębnionego morfologicznie i funkcjonalnie jądra komórkowego. Rozdzielenie replikacji i transkrypcji zachodzących w jądrze, od translacji przebiegającej w cytoplazmie, pozwoliło eukariontom na niedostępną organizmom prokariotycznym precyzję w kontroli ekspresji genów i syntezy DNA. Z drugiej jednak strony, komórki eukariotyczne zmuszone zostały do stałej kontroli stężenia cząsteczek w obu przedziałach komórkowych oraz ciągłej wymiany cząsteczek między nimi. Jony, metabolity, a nawet małe polipeptydy transportowane są w obu kierunkach biernie, na drodze dyfuzji. Duże

cząsteczki i ich kompleksy przemieszczane są aktywnie — proces ten wymaga energii.

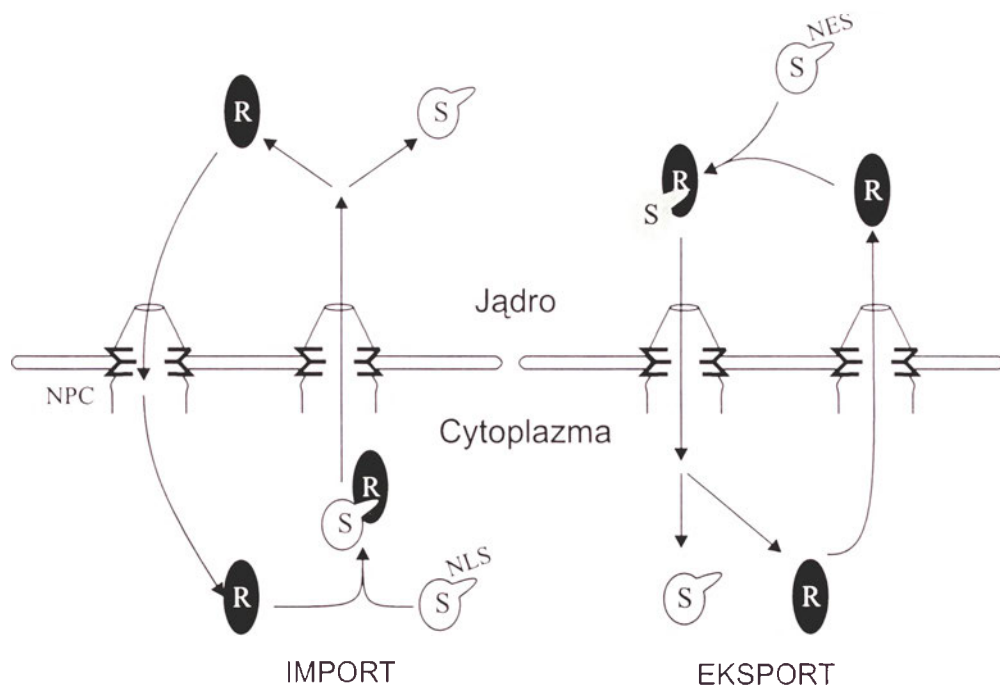
Do jądra komórkowego wędrują przede wszystkim zsyntetyzowane w cytoplazmie białka ważne dla prawidłowej struktury i funkcji jądra. Główną grupą cząsteczek, które muszą zostać przeniesione z jądra komórkowego do cytoplazmy są natomiast kwasy rybonukleinowe (RNA). Ten prosty schemat transportu jądrowo-cytoplazmatycznego, tzn. białka jądrowe wędrujące do jądra komórkowego i cząsteczki RNA przemieszczające się do cytoplazmy, jest w rzeczywistości dużo bardziej skomplikowany. Wiemy obecnie, że niektóre białka są w pewnych sytuacjach eksportowane z jądra komórkowego do cytoplazmy. Opisano również grupę polipeptydów przemieszczających się stale między cytoplazmą i jądrem. Z racji ich ciągłej wędrowki nazywamy je białkami wahadłowymi (ang. *shuttle*). Z kolei niektóre RNA transportowane są w komórce z cytoplazmy do jądra. Przykładem takich właśnie cząsteczek są niektóre niskocząsteczkowe, bogate w urydynam jądrowe RNA (snRNA), które w trakcie swojej biogenezy tylko czasowo przebywają na terenie cytoplazmy. Choć tuż po transkrypcji wędrują one z jądra komórkowego do cytoplazmy, to jednak powracają do jądra, gdzie pełnią przypisane im funkcje.

Transport białek i rybonukleoprotein (RNP) przez pory jądrowe jest procesem selektywnym — spośród wielu cząsteczek muszą zostać wybrane tylko te, które mają być przeniesione na drugą stronę otoczki jądrowej. Transportowane cząsteczki muszą posiadać na swojej powierzchni sygnały precyzyjnie roz-

poznawane przez maszynę transportującą. Sygnały takie nie tylko wyznaczają, które z cząsteczek mają zostać przeniesione na drugą stronę otoczki jądrowej, ale również informują o kierunku transportu.

Białka, które są transportowane z cytoplazmy do jądra komórkowego posiadają sygnał lokalizacji jądrowej, w skrócie określany jako NLS (ang. *nuclear localization signal*). Z kolei białka, które są eksportowane z jądra do cytoplazmy posiadają sygnał eksportu NES (ang. *nuclear export signal*). Zarówno import jak i eksport polipeptydów zależy od specjalnych białek, które nazywamy receptorami. Zakłada się, że mechanizm importu i eksportu jest podobny. Receptory importu znajdujące się w cytoplazmie rozpoznają białka posiadające sygnał lokalizacji jądrowej. Utworzony kompleks substrat-receptor przemieszcza się przez por otoczki jądrowej, dociera do nukleoplazmy, gdzie receptor oddysocjowuje od substratu. Substrat pozostaje w jądrze komórkowym, a uwolniony receptor powraca do cytozolu po nowy ładunek. Receptory eksportu z kolei łączą się z substratem w jądrze komórkowym. Razem z substratem docierają do cytoplazmy. Po wykonaniu zadania receptor eksportu wraca do jądra komórkowego pozostawiając w cytoplazmie przeniesiony substrat. Ponieważ zarówno receptory eksportu jak i importu poruszają się ciągle między cytoplazmą i jądrem, przedstawiony model nazywa się czasem modelem wahadlowych receptorów [1, 2] (Ryc.1).

W transporcie cząsteczek przez otoczkę jądrową mogą brać udział także inne czynniki białkowe, które



Ryc. 1. Model „wahadlowych receptorów”. R – receptor, S – substrat, NLS – sygnał lokalizacji jądrowej, NES – sygnał eksportu z jądra komórkowego do cytoplazmy, NPC – por jądrowy [2].

przyłączając się do substratu umożliwiając jego rozpoznanie przez odpowiedni receptor. Białka takie nazywamy adaptorami lub białkami adaptorowymi. Receptor rozpoznaje w takim przypadku sygnał lokalizacji subkomórkowej znajdujący się na cząsteczce adaptoru. Polipeptydy tego typu odgrywają olbrzymią rolę w eksporcie RNA.

II. Jądro komórkowe. Pory jądrowe

Jądro komórkowe otoczone jest otoczką jądrową składającą się z dwóch błon rozdzielonych przestrzenią okołojądrową (pery nuklearną). Zewnętrzna otoczka pozostaje w ciągłości z szorstkim retikulum endoplazmatycznym (ER) [3], a przestrzeń pery nuklearną w ciągłości ze światłem ER. Wymiana cząsteczek między nukleoplazmą a cytozolem odbywa się w ściśle określonych miejscach otoczki jądrowej za pośrednictwem tkwiących w niej struktur zwanych porami jądrowymi (NPC) [4]. Por jądrowy jest olbrzymią strukturą o masie około 125 MDa [5]. Jest zatem około 30 razy większy od rybosomu. Zasadniczym elementem NPC jest cylindryczna część podstawowa tkwiąca w otoczce jądrowej. Od strony cytoplazmatycznej do części podstawowej przylega pierścień cytoplazmatyczny, a od strony nukleoplazmy pierścień jądrowy. Od pierścienia cytoplazmatycznego odchodzi 8 struktur fibrylarnych zwanych włókienkami. Do pierścienia jądrowego przyłączona jest struktura morfologicznie przypominająca kosz (ang. *basket*) [6-10]. Występujący w części podstawowej kanał o średnicy około 9 nm pozwala na swobodną dyfuzję jonów, metabolitów oraz małych białek (mniejszych niż 40-60 kDa). Większe cząsteczki muszą być transportowane aktywnie, do ich transportu wymagana jest energia [11]. Białka budujące NPC nazywamy ogólnie nukleoporynami. W skład pojedynczego kompleksu porowego wchodzi około 50-100 różnych peptydów. Większość z nich powtórzona jest w każdym kompleksie wielokrotnie (8 lub 16 razy) dając w sumie około 1000 peptydów budujących jeden NPC [12-14]. Wiele nukleoporyn posiada charakterystyczne motywy aminokwasowe: wielokrotnie powtórzoną sekwencję FXFG (np. Nup153p, p62) [15, 16] lub GLFG (np. Nup98p) [17]. Z badań przeprowadzonych *in vitro*, a także wstępnych badań *in vivo* wynika, że motywy te odpowiedzialne są za oddziaływanie z czynnikami kierującymi transportem cząsteczek. Nukleoporyny posiadają również sekwencje aminokwasowe, które pozwalają im oddziaływać ze sobą umożliwiając powstanie skomplikowanego kompleksu porowego. Są to przede wszystkim sekwencje warunkujące po-

wstanie α -helis zdolnych do tworzenia struktur typu „*coiled-coil*”, czy motywów tzw. zamka leucynowego. W pewnych nukleoporynach znaleziono również motywy palców cynkowych, a także inne domeny charakterystyczne dla białek wiążących RNA [14].

III. Import

III-1. Sygnały lokalizacji jądrowej

Klasycznym sygnałem lokalizacji jądrowej białek (NLS) jest sekwencja kilku zasadowych aminokwasów. Najlepiej scharakteryzowany NLS, występujący w dużym antygenie T wirusa SV 40, to prosta sekwencja siedmiu aminokwasów: PKKKRKV [18]. Sygnały tego typu często znajdujemy w białkach jądrowych. Podobny w charakterze NLS (reszty aminokwasów zasadowych) został zlokalizowany w nukleoplazminie [19]. Sygnał lokalizacji jądrowej nukleoplazminy jest jednak dwuelementowy — składa się z dwóch zasadowych motywów rozdzielonych kilkoma resztami aminokwasowymi. Ponieważ w wielu białkach jądrowych znaleziono przypominające NLS motywy aminokwasowe, sądzono, że białka korzystają tylko z jednego szlaku wprowadzającego je do jądra komórkowego. Szybko jednak okazało się, że jest to założenie błędne. Oprócz klasycznego, tzw. zasadowego sygnału importu, istnieją jeszcze inne sekwencje aminokwasowe kierujące białka z cytoplazmy do jądra komórkowego. Jednym z lepiej scharakteryzowanych sygnałów NLS o zupełnie innej strukturze jest tzw. domena M9 występująca w białku hnRNP A1 [20, 21]. Białko A1 jest jednym z białek kompleksów rybonukleoproteiny zawierających mRNA (tzw. hnRNP). Domena M9 nie przypomina klasycznego NLS z SV 40, jest znacznie dłuższa (38 aminokwasów) [22, 23], zawiera sporo reszt glicynowych oraz aminokwasów aromatycznych. Białko hnRNP A1 jest białkiem wahadłowym, przemieszczającym się ciągle między cytoplazmą i jądrem. Ciekawe, że domena M9 jest nie tylko sygnałem importu A1 do jądra, ale również umożliwia eksport tego białka do cytoplazmy.

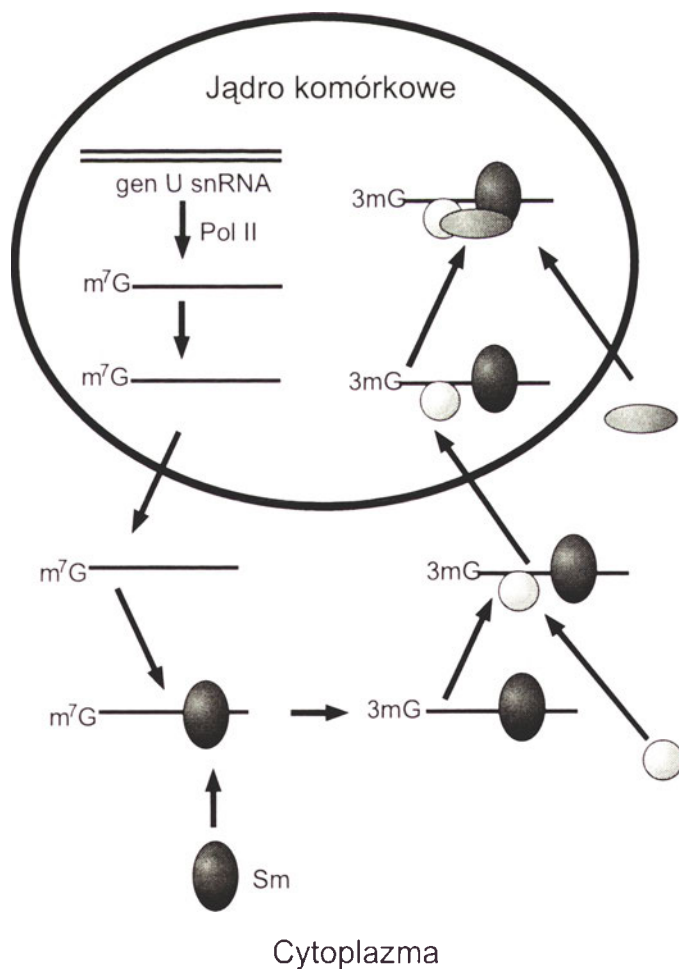
Odmienny sygnał importu opisano w przypadku innego białka kompleksu hnRNP — białka K. Białko to ma dwie sekwencje lokalizacji jądrowej: klasyczny NLS oraz tzw. KNS, element strukturalnie nie związany z żadnym innym sygnałem importu [24]. KNS podobnie jak domena M9 hnRNP A1 odpowiedzialny jest nie tylko za import, ale również za eksport hnRNP K z jądra komórkowego do cytoplazmy.

Bardzo ciekawym, i nie do końca wyjaśnionym, zagadnieniem jest import białek rybosomowych do

nukleoplazmy i dalej do jąderka — miejsca składania podjednostek rybosomów. Nie wiemy czy białka rybosomowe transportowane są do jądra każde osobno, czy też tworzą w cytoplazmie kompleksy i dopiero w takiej formie forsują otoczkę jądrową. Badania kilku ludzkich i drożdżowych białek rybosomowych ujawniły, że niektóre z nich posiadają kilka niezależnych sygnałów lokalizacji jądrowej. Po utworzeniu podjednostek rybosomów sygnały te muszą być w jakiś sposób maskowane, w przeciwnym razie podjednostki byłyby ponownie importowane z cytoplazmy, a przecież mają tam pozostać i, utworzywszy aktywne rybosomy, uczestniczyć w translacji. Najlepiej scharakteryzowane sygnały importu białek rybosomowych składają się z lub zawierają krótkie zasadowe peptydy, które choć przypominają na pierwszy rzut oka klasyczny NLS, wykorzystują inny, specyficzny dla nich szlak importu [25-30].

Warto również w tym miejscu wspomnieć o imporcie snRNP. Uczestniczące w wycinaniu intronów jądrowe niskocząsteczkowe RNA (snRNA U1, U2,

U4, U5) transkrybowane przez polimerazę II RNA, eksportowane są po transkrypcji z jądra komórkowego do cytoplazmy [31]. Tak jak wszystkie inne transkrypty polimerazy II RNA, snRNA mają na swoim końcu czapeczkę (ang. *cap*). Czapeczka to zmetylowana w pozycji 7 guanozyna połączona z pierwszym transkrybowanym nukleotydem cząsteczki RNA mostkiem 5'-5' trifosforanowym. W cytoplazmie snRNA rozpoznawane są przez grupę białek zwanych białkami Sm [32]. Białka Sm rozpoznają charakterystyczną sekwencję RNA (PuA(U)_nGPu) [33, 34], określaną często jako miejsce wiązania Sm. Po utworzeniu kompleksu z białkami Sm dochodzi w cytoplazmie do hipermetylacji struktury czapeczki na 5' końcu cząsteczek snRNA — włączona kotranskrypcyjnie monometyloguanozyna (m^7G) otrzymuje dwie dodatkowe grupy metylowe tworząc trimetyloguanozynę ($m^{2,2,7}G$) [35]. Tak zmodyfikowany niskocząsteczkowy jądrowy RNA wraz z oddziałującymi z nim białkami wraca do jądra komórkowego (Ryc.2).



Ryc. 2. Jądrowo-cytoplazmatyczny transport U snRNA transkrybowanych przez polimerazę II RNA. Nowo powstałe snRNA są eksportowane z jądra komórkowego do cytoplazmy. W cytoplazmie snRNA rozpoznawane są przez grupę białek zwanych białkami Sm. Zmodyfikowany kotranskrypcyjnie koniec 5' snRNA (m^7G) zostaje w cytoplazmie dodatkowo zmetylowany tworząc $3mG$ ($m^{2,2,7}G$). Kompleks snRNP złożony z snRNA posiadającego trimetyloguanozynę na końcu 5', białek Sm oraz dodatkowych peptydów, powraca do jądra komórkowego. Niektóre białka wchodzące w skład dojrzałego snRNP transportowane są z cytoplazmy do jądra komórkowego samodzielnie i dopiero na terenie jądra przylączają się do snRNP.

Sygnal importu snRNP (kompleks snRNA i białek) jest dwuczęściowy, składa się z jeszcze nie najlepiej scharakteryzowanego motywu znajdującego się w kompleksie białek Sm [31, 36] oraz ze specyficznej, charakterystycznej tylko dla małych jądrowych RNA czapeczki — trimetyloguanozyny ($m^{2,2,7}G$) [37-41].

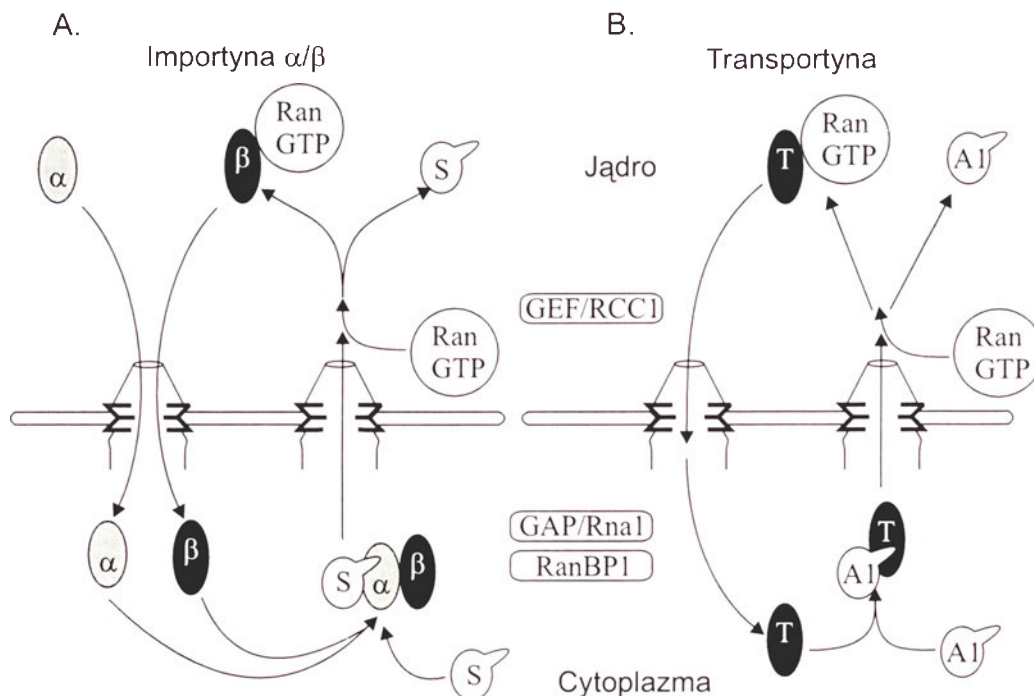
III-2. Import białek o klasycznym sygnale lokalizacji jądrowej

Zgodnie z teorią wahadłowego receptora, białka posiadające sygnal lokalizacji jądrowej rozpoznawane są w cytoplazmie przez receptor i razem z nim przemieszczane są na drugą stronę otoczki jądrowej. Przełomem w poznaniu mechanizmów importu było opracowanie systemu *in vitro* [42-44], który dostatecznie dobrze imitował import zachodzący w żywej komórce. W systemie tym obserwuje się import (jądrową akumulację) fluorescencyjnie wyznakowanego substratu przez komórki łagodnie potraktowane dygitoniną. Podczas przygotowania komórek dochodzi do perforacji błony cytoplazmatycznej i usunięcia rozpuszczalnych składników komórki. Aktywny transport zależy od dodania do układu frakcji cytozolowej [44]. Układ taki pozwolił na oczyszczenie, a następnie molekularną charakterystykę czynników niezbędnych w procesie importu białek do jądra komórkowego. Stosując jako substrat BSA z kowalencyjnie przyłączonymi peptydami zawierającymi sy-

gnały NLS, scharakteryzowano cztery takie czynniki: importynę α (zwaną również karioferyną α), importynę β (karioferyna β), które jako heterodimer tworzą właściwy receptor sekwencji NLS [45, 46], oraz dwa inne białka: małą GTPazę Ran/TC4 [47-49] i NTF 2 (pp15 lub p10) [50, 51].

W cytoplazmie białka posiadające klasyczny, zasadowy NLS rozpoznawane są przez heterodimer importyn α i β [52, 53]. Za wiązanie NLS odpowiedzialna jest importyna α . To na jej powierzchni znajduje się motyw rozpoznający sygnal lokalizacji jądrowej. Na swoim końcu aminowym importyna α posiada miejsce wiązania importyny β , tzw. domenę IBB (ang. *importin β binding*) [54, 55]. Importyna β odpowiedzialna jest za cumowanie kompleksu receptor-substrat ($\alpha/\beta/NLS$) do cytoplazmatycznych włókienek porów jądrowych [56]. Etap ten nie wymaga energii. Drugi etap importu to translokacja kompleksu przez kanał NPC. Translokacja jest procesem zależnym od energii, wymaga hydrolizy GTP przez Ran. W procesie translokacji bierze również udział białko NTF 2. Translokacja kończy się na pierścieniu wewnętrznym NPC. Dochodzi tutaj do rozdziału kompleksu $\alpha/\beta/NLS$. Substrat zostaje uwolniony do nukleoplazmy, a podjednostki receptora: importyna α i importyna β , niezależnie od siebie wracają do cytoplazmy [57].

Mechanizm importu białek o klasycznym, zasadowym sygnale lokalizacji jądrowej przedstawia schematycznie Ryc. 3a.



Ryc. 3. Import białek posiadających klasyczny NLS (a) i import białka A1 kompleksu hnRNP (b). W imporcie peptydów posiadających klasyczny NLS biorą udział importyny α i β . Receptorem importu A1 jest transportyna (T). Zarówno w jednym jak i w drugim przypadku, w jądrze komórkowym dochodzi do oddysocjowania substratu (S i A1) od receptora (α/β i T) w wyniku wiązania się GTPazy Ran do receptora. Wysokie stężenie Ran w formie RanGTP w jądrze utrzymywane jest dzięki działaniu białka GEF/RCC1, które jest zasocjowane z chromatyną [2].

W jaki sposób przemieszczający się w NPC kompleks orientuje się czy znajduje się w części cytoplazmatycznej, czy też jest już w jądrze komórkowym? Kluczową rolę odgrywa tu GTPaza Ran. Ran występuje w komórkach w dużej ilości, i chociaż wykrywa się ją głównie w jądrze, przyjmuje się, że kursuje między cytoplazmą i jądrem komórkowym. Tak jak większość regulacyjnych GTPaz, jej aktywność GTPazowa jest niska. Aktywność ta wzrasta maksymalnie tylko wtedy, gdy Ran wiąże się z dwoma białkami: RanGAP1 (u drożdży Rna1p) i RanBP1/Yrb1p. Po hydrolizie GTP, Ran wymaga również udziału czynnika, aby wymienić GDP na GTP. Czynnikiem tym jest GEF (ang. *guanine exchange factor*) zwany również RCC1 (u drożdży Prp20p). Zasadnicze znaczenie dla funkcji Ran ma rozmieszczenie białek, które z tą GTPazą oddziałują. Oba białka stymulujące aktywność GTPazową Ran znajdują się w cytoplazmie [57, 58], natomiast GEF/RCC1 występuje głównie w jądrze komórkowym [59]. Wpływa to oczywiście na GTPazę Ran: w jądrze komórkowym większość Ran znajduje się w formie Ran-GTP, w cytoplazmie natomiast w formie Ran-GDP. Ran związany z GTP wiąże się z importyną powodując jej dysocjację z kompleksu $\alpha/\beta/\text{NLS}$ i uwolnienie substratu. Proces ten zachodzi w jądrze komórkowym [60] (Ryc. 4).

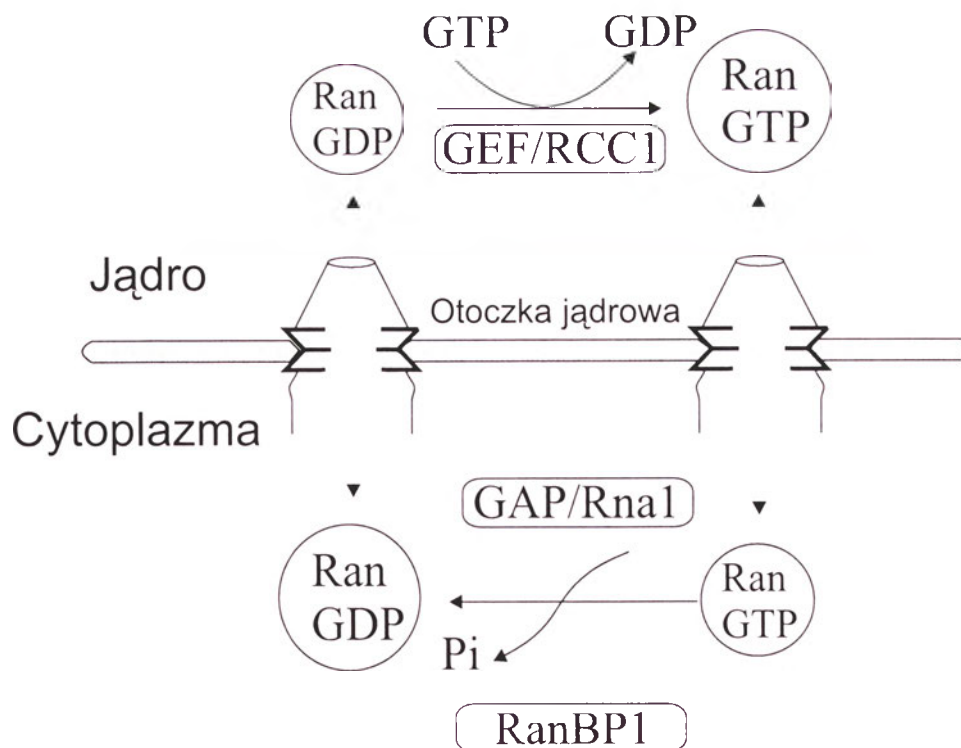
III-3. Import białek nie posiadających klasycznego sygnału lokalizacji jądrowej

III-3.1. Transportyna — receptor importu białka A1 hnRNP

Jak już wspomniano wcześniej, część białek jądrowych wykorzystuje inne niż klasyczny NLS sygnały importu do jądra komórkowego. Domena M9 białka A1 hnRNP rozpoznawana jest w cytoplazmie bezpośrednio przez inny receptor importu – transportynę [22, 23]. W transporcie A1 nie biorą udziału ani importyna α , ani importyna β , ale oczywiście niezbędna jest GTPaza Ran. Transportyna wiąże się również do niektórych innych białek kompleksu hnRNP, chociaż nie mają one typowej domeny M9. Ryc. 3b przedstawia schemat importu białka A1. Funkcjonalnie podobną, ale strukturalnie zupełnie inną domenę posiada białko K, tzw. KNS. Nie znamy jeszcze receptora, który odpowiedzialny jest za transport białka K z cytoplazmy do jądra komórkowego.

III-3.2. Receptory importu białek rybosomowych

Już pierwsze obserwacje importu białek rybosomowych u drożdży sugerowały, że białka te korzystają ze specyficznego szlaku, odrębnego od dróg



Ryc. 4. Subkomórkowa lokalizacja dwóch form GTPazy Ran w zależności od związanego nukleotydu guaninowego. W cytoplazmie większość Ran znajduje się w postaci Ran-GDP. W jądrze natomiast Ran związany jest głównie z GTP. W obu przedziałach komórkowych stan w jakim znajduje się Ran regulują specyficzne białka. W cytozolu aktywność GTPazową Ran stymulują cytoplazmatyczne GAP/Rna1 oraz RanBP1, stąd wysokie stężenie formy Ran-GDP. W jądrze, zasocjowany z chromatyną GEF/RCC1 powoduje z kolei wymianę GDP na GTP, co w konsekwencji prowadzi do dużego stężenia Ran-GTP. Stan w jakim znajduje się GTPaza Ran jest dla kompleksu receptor/substrat sygnałem informującym o aktualnym położeniu w komórce (cytozol *versus* nukleoplazma) [2].

wykorzystywanych przez pozostałe białka jądrowe. W komórkach drożdży z mutacją w genie kodującym nukleoporynę Nsp1p [61] uniemożliwiająca import białek o klasycznym sygnale NLS, import polipeptydów posiadających sygnał pochodzący z jednego z białek rybosomowych (L25) przebiegał normalnie. Udało się zidentyfikować drożdżowe białka zaangażowane w import białka rybosomowego L25. Jednym z tych białek jest Kap123p. Ponieważ uszkodzenie genu Kap123p w komórkach drożdży nie jest letalne, poszukiwano innego polipeptydu, który jest receptorem importu dla białek rybosomowych w przypadku braku Kap123p. Okazało się, że białkiem tym jest Pse1p, które w zastępstwie Kap123p rozpoznaje sygnał lokalizacji jądrowej L25, łączy się z nim i bierze udział w jego transporcie do jądra komórkowego. W przeciwieństwie do genu Kap123p, delekcja genu Pse1p jest dla drożdży letalna [62, 63]. Odpowiednikiem Pse1p w komórkach ludzkich jest RanBP5 (ang. *Ran binding protein 5*), ale jego roli w imporcie białek rybosomowych jeszcze nie potwierdzono [64]. Oba białka, które uważa się za receptory importu białek rybosomowych (Kap123p i Pse1p), należą do rodziny białek wykazujących podobieństwo do importyny β .

Nasza wiedza o imporcie białek rybosomowych jest nadal szczątkowa. Nadal nie potrafimy odpowiedzieć na zasadnicze pytania: czy wszystkie białka rybosomów korzystają z tych samych receptorów oraz w jaki sposób są one transportowane do jądra – pojedynczo czy w postaci kompleksów.

III-3.3. Białka uczestniczące w imporcie snRNP

Jak już wspomniano przy omawianiu sygnałów importu cząsteczek do jądra komórkowego, sygnał umożliwiający powrót snRNP z cytoplazmy do jądra jest dwuczłonowy: składa się ze specyficznie zmodyfikowanej czapeczki — trimetyloguanozyny oraz z jakiegoś bliżej nie scharakteryzowanego elementu w kompleksie białek Sm [39,40]. O ile białka Sm są niezbędne przy imporcie wszystkich badanych snRNA, i to zarówno w oocytach *Xenopus laevis*, jak i w komórkach HeLa, to wpływ trimetylowanej czapeczki zależy od rodzaju snRNA i komórek użytych do badań. W oocytach trimetylowana czapeczka na końcu 5' cząsteczki RNA niezbędna jest przy imporcie U1, stymuluje jedynie import U4, a w przypadku U5 jego rola jest jeszcze mniejsza. W komórkach HeLa we wszystkich analizowanych przypadkach czapeczka wpływała jedynie na kinetykę importu, a import zależał bezwzględnie od białek Sm [65].

Import kompleksów snRNP odbywa się innym szlakiem niż import białek posiadających klasyczny NLS. Wydaje się, że w imporcie nie uczestniczy importyna α , ale bierze w nim udział importyna β . Niedawno udało się wyizolować z komórek HeLa białko adaptorowe, które uczestniczy w imporcie U1 i U5. Snurportyna 1, bo tak nazwano to białko, rozpoznaje trimetylowaną czapeczkę na 5' końcu snRNA. Jest to polipeptyd wykazujący pewne podobieństwo do importyny α , podobnie jak ona posiada w swojej części N-końcowej tzw. domenę IBB, niezbędną dla wiązania importyny β . Wydaje się, że snurportyna nie oddziałuje bezpośrednio z żadnym z białek Sm, a ponieważ białka Sm odgrywają zasadniczą rolę w imporcie snRNP poszukuje się obecnie innego polipeptydu uczestniczącego w tym procesie [66].

IV. Eksport

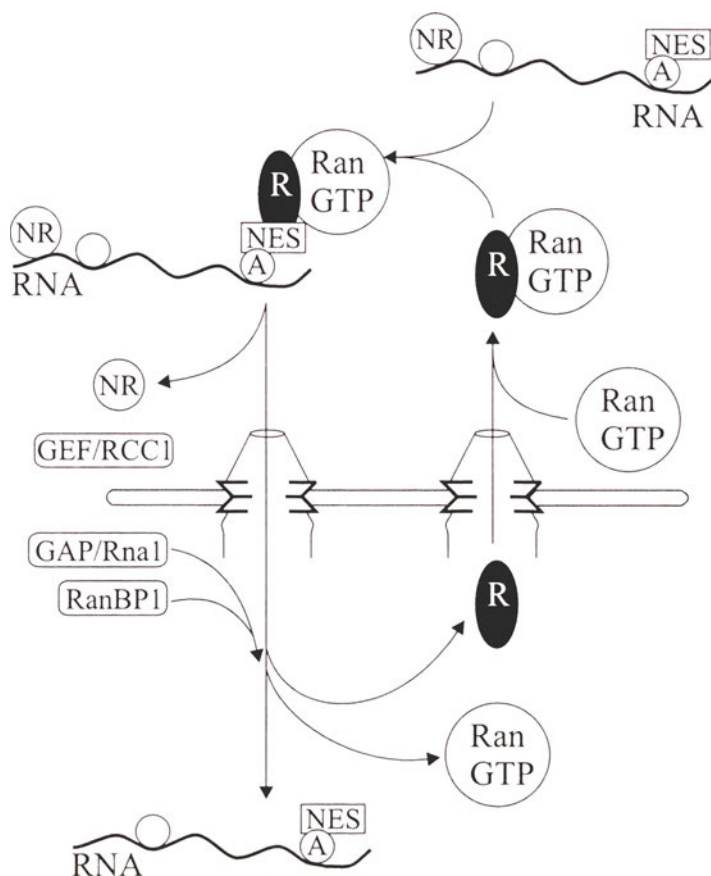
Chociaż podstawową grupą cząsteczek transportowanych z jądra komórkowego do cytoplazmy są RNA, to omawiając eksport RNA właściwie zajmujemy się eksportem białek. Cząsteczki RNA nie są transportowane do cytoplazmy w postaci nagich łańcuchów rybonukleinowych, ale jako kompleksy RNA-białka. Wśród oddziałujących z cząsteczkami RNA białek są polipeptydy adaptorowe, które posiadają na swojej powierzchni sygnały eksportu NES. To właśnie białka adaptorowe rozpoznawane są przez odpowiednie receptory przenoszące kompleksy rybonukleoproteinowe z jądra komórkowego do cytoplazmy (Ryc. 5). Trudno w to uwierzyć, ale białka zdolne do opuszczania jądra komórkowego znane są od dawna. Prawie 40 lat temu, Goldstein doniósł [67], że polipeptydy mogą, w pewnych sytuacjach, opuszczać jądro komórkowe i być transportowane do cytoplazmy, a potem powracać do jądra. Zaobserwowano, że jeżeli jądro komórki ameby zawierające znakowane radioaktywnie białka przeniesiono do innej ameby, to radioaktywne białka po pewnym czasie wykrywano w obu jądrach. Ten prosty eksperyment sugerował istnienie białek, które poruszają się pomiędzy jądrem a cytoplazmą.

Oczywiście receptor może również w pewnych przypadkach rozpoznawać bezpośrednio sekwencję lub strukturę cząsteczki RNA. Wiemy już, że tak jest w przypadku eksportu cząsteczek tRNA.

Eksport białek i RNA z jądra komórkowego badamy obecnie dwiema metodami: jedną z nich jest wstrzykiwanie badanych cząsteczek do oocytów *Xenopus laevis* oraz do komórek somatycznych (np.

HeLa), drugą tzw. metoda heterokarionów, czyli fuzji komórek pochodzących z dwóch różnych organizmów. Istotnych informacji dostarczają badania nad

nie lata przyniosły szereg ważnych obserwacji i charakterystykę pierwszych receptorów eksportu, które ogólnie nazwano eksportynami.



Ryc. 5. Etapy eksportu RNA. Cząsteczki RNA są eksportowane jako duże kompleksy RNP. Wśród białek oddziałujących z RNA znajdują się białka adaptorowe (A) posiadające sygnały eksportu (NES), oraz peptydy warunkujące retencję jądrową (NR). Białka adaptorowe rozpoznawane są w jądrze komórkowym przez receptory (R). Rozpoznanie adaptora przez białko receptorowe możliwe jest w obecności GTPazy Ran związanej z GTP (RanGTP). Wysokie stężenie RanGTP w jądrze komórkowym utrzymywane jest dzięki białku GEF/RCC1. Peptydy warunkujące retencję jądrową muszą zostać usunięte z RNP przed opuszczeniem jądra komórkowego. Po stronie cytoplazmatycznej receptor odłącza się od substratu pod wpływem dwóch białek cytoplazmatycznych (GAP/Rna1 i RanBP1), które stymulują hydrolizę GTP do GDP i przejście GTPazy Ran ze stanu RanGTP do stanu Ran GDP [2].

transportem białek i RNA z jądra komórkowego do cytoplazmy w komórkach drożdży.

IV-1. Sygnały eksportu z jądra komórkowego do cytoplazmy

W przeciwieństwie do substratów importu, które są stosunkowo proste i małe, substraty eksportu są często duże i złożone. Z jądra komórkowego muszą zostać wyeksportowane wielkie kompleksy RNA i białek, takie jak podjednostki rybosomów czy też hnRNP. W porównaniu z naszą wiedzą na temat importu cząsteczek z cytoplazmy do jądra komórkowego, dane dotyczące eksportu są fragmentaryczne. Wynika to głównie z braku odpowiedniego systemu *in vitro* pozwalającego na łatwą identyfikację i charakterystykę białek uczestniczących w transporcie z jądra komórkowego do cytoplazmy. Mimo to, ostat-

IV-1.1. Elementy cząsteczek RNA ważne dla ich transportu z jądra komórkowego do cytoplazmy. Retencja jądrowa

Badania eksportu RNA wykazały, że jest to proces zależny od energii i możliwy do wysycenia nadmiarem substratu [68-71]. Ta druga obserwacja sugerowała istnienie czynnika limitującego transport RNA z jądra komórkowego do cytoplazmy. Co więcej, wykazano, że czynnik ten jest inny dla różnych rodzajów RNA: tRNA, snRNA, mRNA i 5S rRNA [71]. Należy pamiętać, że czynniki te nie muszą być receptorami eksportu *per se*, ale mogą być również cząsteczkami adaptorowymi, które łączą właściwy receptor z odpowiednim rodzajem RNA.

Przed omówieniem białek biorących udział w eksporcie cząsteczek RNA, zostaną krótko omówione elementy strukturalne związane z eksportem poszczególnych klas RNA. Sekwencje te są najczęściej

miejscami wiązania odpowiednich białek adaptorowych.

W przypadku snRNA mamy do czynienia z bardzo prostym elementem rozpoznawanym przez białka adaptorowe. Eksport snRNA zależy od obecności 7-metyloguanozyny na 5' końcu cząsteczki [71].

Na eksport mRNA wpływa wiele różnych elementów, trudno tutaj wskazać jedną sekwencję warunkującą transport. Stałe elementy eukariotycznych mRNA np. czapeczka i sekwencja poli(A), pomimo że mają wpływ na kinetykę eksportu, nie są absolutnie niezbędne [71]. Wiadomo, że np. histonowe mRNA nie mają sekwencji poli(A), a są przecież sprawnie przenoszone do cytoplazmy. Na eksport mRNA wpływ ma sekwencja samego mRNA. Oczywiście, z uwagi na olbrzymie zróżnicowanie sekwencyjne cząsteczek mRNA, nie można tutaj oczekiwać prostych motywów eksportu, należy jednak zwrócić uwagę, że wszystkie mRNA rozpoznawane są przez białka kompleksu hnRNP, i w tej postaci transportowane do cytoplazmy. Dla różnych mRNA skład kompleksu hnRNP może być ilościowo i jakościowo inny. Trzeba więc chyba z góry założyć, że w eksporcie mRNA uczestniczyć będzie kilka białek wiążących się do RNA, ale nie do ściśle określonych motywów nukleotydowych.

Warto również zwrócić uwagę na fakt, że niektóre cząsteczki RNA są w jądrze komórkowym aktywnie zatrzymywane (ang. *nuclear retention*). Dotyczy to szczególnie cząsteczek, które zwykle nie opuszczają jądra komórkowego np. U6 snRNA. Należy jednak pamiętać, że i te cząsteczki w specyficznych warunkach podziału mitotycznego, tzn. po zaniku błony jądrowej, pojawiają się czasowo w cytozolu. Wiemy, że po odtworzeniu błony jądrowej cząsteczki U6 potrafią wrócić z cytoplazmy do nukleoplazmy. W okresie między podziałami mitotycznymi U6 nigdy nie opuszcza jądra [72]. Retencja cząsteczek RNA w jądrze komórkowym stanowi niezwykle ważny mechanizm kontroli stopnia przygotowania substratu do eksportu [73]. Pre-mRNA zawierające introny najpierw muszą zostać poddane procesom dojrzewania, a dopiero po ich zakończeniu gotowe są do transportu przez błonę jądrową do cytoplazmy. Oddziaływanie pre-mRNA z czynnikami biorącymi udział w wycinaniu intronów uniemożliwia rozpoznanie takiego niedojrzałego mRNA przez maszynę transportu. Oczywiście po zakończeniu wycinania intronów białka „przytrzymujące” RNA w jądrze muszą się od niego odłączyć. Sporo wiemy już jak czynniki te rozpoznają pre-mRNA oraz w jaki sposób uczestniczą w wycinaniu intronów i ligacji ekso-

nów. Niestety, niewiele informacji dotyczy końcowego etapu, na którym uwalniany jest dojrzały mRNA. Kandydatem do roli białka odpowiedzialnego za dysocjację czynników uczestniczących w wycinaniu intronów jest Prp22p — helikaza należąca do grupy białek zawierającej motyw DEAD/H [74]. Proces zmian w obrębie RNP przygotowujących cząstkę do eksportu jest bardzo złożony. Niektóre białka zostają przed eksportem z RNP usunięte (np. czynnik ASF/SF2) [75], inne pozostają zasocjowane z RNA (np. hnRNP A1 [76]) nawet w cytoplazmie, a np. CBC — jądrowy kompleks białek rozpoznających czapeczkę towarzyszy cząsteczkom RNA posiadającym m⁷G na swoim 5' końcu w trakcie translatacji, ale oddysocjowuje po stronie cytoplazmatycznej [77].

Niewiele również wiemy jak działają białka odpowiedzialne za retencję RNA w jądrze. Sygnał retencji (NRS — ang. *nuclear retention signal*) scharakteryzowano w przypadku białka C kompleksu hnRNP. NRS w tym białku zdefiniowano jako 78 aminokwasowy segment, który przeniesiony do białka posiadającego sygnał eksportu z jądra komórkowego powodował, że badane białko fuzyjne nie opuszczało jądra komórkowego [78]. Nadal nie znamy mechanizmu retencji, nie wiemy czy białka odpowiedzialne za retencję „kotwiczą” cząstki do struktur jądra komórkowego, czy też wykorzystują inny nieznan bliżej mechanizm.

Specjalne mechanizmy eksportu RNA zmuszone były wypracować retrowirusy. Wirusy te posiadają w swoim genomie introny, które muszą zostać wycięte przed syntezą białek wirusowych. Proces wycięcia intronów z RNA wirusowego, podobnie jak i intronów z pre-mRNA komórki gospodarza, zachodzi oczywiście w jądrze komórkowym w spliceosomie. Sprawa komplikuje się jednak kiedy dochodzi do pakowania cząstek wirusowych. Po replikacji, cały genom RNA wirusa łącznie z intronami, musi przedostać się do cytoplazmy i tam utworzyć nowe wiriony. Jak już wspomniano wcześniej, w jądrze komórek eukariotycznych, mRNA z intronami (pre-mRNA) zostaje zatrzymany i dopiero po wycięciu intronów eksportowany. RNA retrowirusów musi jakoś obejść ten mechanizm i wydostać się z jądra w stanie „niedojrzałym”, tzn. z intronami. Genom wirusa HIV zawiera sekwencję, która umożliwia eksport RNA przed jego złożeniem. Element ten występuje w intronie i określany jest jako RRE (ang. *Rev response element*). RRE rozpoznawany jest przez białko wirusowe zwane Rev [79, 80]. Prostsze retrowirusy np. MPMV (małpi wirus Mason-Pfizera) czy RSV (wirus mięsaka Rousa) posiadają w swoim ge-

nomie element określany jako CTE (ang. *cellular transport element*). W przeciwieństwie do wirusa HIV proste retrowirusy nie kodują żadnego specjalnego białka umożliwiającego eksport wirusowego RNA, korzystają one z białka lub białek gospodarza [81, 82].

IV-1.2. Białka adaptorowe. Sygnały eksportu z jądra komórkowego do cytoplazmy (NES)

Jednym z najlepiej scharakteryzowanych białek adaptorowych jest białko Rev wirusa HIV. Rev umożliwia transport wirusowego RNA do cytoplazmy rozpoznając i łącząc się ze specyficzną sekwencją, tzw. RRE (ang. *Rev response element*) występującą w RNA HIV. Część białka Rev rozpoznająca RRE nosi nazwę domeny wiążącej RNA. Wiadomo było od dawna, że oprócz domeny wiążącej RNA istnieje w Rev inna domena, tzw. domena aktywująca, bez której białko nie potrafi transportować wirusowego RNA do cytoplazmy. Rev ze zmutowaną domeną aktywującą wiąże RNA posiadający motyw RRE, ale nie jest w stanie wykonać swojego zadania do końca — RNA pozostaje w jądrze komórkowym. Przez długi czas nie było jasne czy Rev bierze bezpośrednio udział w transporcie RNA, czy też hamuje wycinanie intronów i uwalnia jedynie wirusowy RNA ze spliciosomu. Odpowiedź na to zasadnicze pytanie przyniosły badania wykorzystujące oocyty żaby szponiastej. Sekwencję RRE wprowadzono do intronu nie związanego z wirusem HIV prekursora mRNA i taki prekursor wstrzykiwano do jądra komórkowego oocytu *Xenopus laevis*. W jądrze zachodziło wycinanie intronów. Dojrzały, pozbawiony intronów mRNA był eksportowany do cytoplazmy, a intron, podobnie jak to się zwykle dzieje, pozostawał w jądrze. Jeżeli jednak oprócz prekursora, do jądra oocytu wprowadzono białko Rev to intron transportowany był do cytoplazmy. Badania te dowiodły, że Rev działa bezpośrednio na eksport RNA z jądra komórkowego [83]. Bliższe badania domeny aktywującej Rev wykazały, że zawiera ona sygnał eksportu z jądra komórkowego do cytoplazmy tzw. NES (ang. *nuclear export signal*). NES białka Rev jest bardzo prosty — jest to krótka sekwencja aminokwasowa bogata w leucynę (LPPLERLTLD) [84]. Pokazano również, że przeniesienie motywu NES do innego białka wystarcza do nadania mu zdolności opuszczania jądra komórkowego. Nawet chemiczne związanie kilku peptydów (ang. *crosslink*) zawierających sekwencję NES do BSA wystarcza, aby tak zmieniona albumina, po wstrzyknięciu do jądra, transportowana była do cytoplazmy. Wstrzyknięcie dużej ilości substratu (BSA-NES) powoduje nie tyl-

ko wysycenie własnego eksportu, ale również wysyca eksport snRNA oraz 5S rRNA, nie wpływając natomiast na transport tRNA i mRNA. Sugeruje to, że w eksporcie snRNA i 5S rRNA uczestniczą białka posiadające NES typu Rev. Dużo wcześniej pokazano, że eksport 5S rRNA zależy od czynnika transkrypcyjnego TFIIIA oraz od białka rybosomowego L5 [85]. Czynniki TFIIIA posiada sekwencję, która przypomina NES występujący w białku Rev wirusa HIV. Co więcej, sekwencja ta przeniesiona do białka Rev funkcjonalnie zastępowała naturalny wirusowy sygnał eksportu. Można więc sobie wyobrazić, że wysycenie eksportu 5S rRNA przez NES/BSA polega na współzawodnictwie między NES/BSA i TFIIIA o wspólny receptor. Wiemy jednak z wcześniejszych prac, że w eksporcie 5S rRNA może brać udział również inne białko — L5. Białko to nie posiada NES typu Rev. Pomimo to eksport 5S zostaje zahamowany, jeżeli wysycimy nadmiarem substratu eksport Rev. Sugeruje to istnienie dodatkowego czynnika uczestniczącego w eksporcie 5S, a który posiada podobny do Rev sygnał eksportu.

Wkrótce sygnały podobnego typu zostały opisane w przypadku innych białek, które potrafią opuszczać jądro komórkowe. NES typu Rev zidentyfikowano w inhibitorze zależnej od cAMP kinazy białek (PKI) [86], inhibitorze czynnika transkrypcyjnego IκBα [86, 87], białka wiążącego się z GTPazą Ran — RanBP1 [88, 89] i kinazy MAPKK [90]. We wszystkich przypadkach stwierdzono, że sekwencja NES odpowiedzialna była za lokalizację cytoplazmatyczną białka. Znane są dwa inne sygnały eksportu, oba omawiane już w części dotyczącej sygnałów lokalizacji jądrowej. Domena M9 białka hnRNP A1 i KNS białka hnRNP K to dwa przykłady sekwencji, które odpowiedzialne są za ciągłe przemieszczanie się obu białek z cytoplazmy do jądra i z jądra do cytoplazmy. Wbrew funkcjonalnemu podobieństwu oba sygnały wykorzystują swoiste drogi eksportu, co więcej, są one różne od szlaku z którego korzystają białka wyposażone w NES typu Rev.

Eksport niskocząsteczkowych jądrowych RNA (snRNA) transkrybowanych przez polimerazę II RNA zależy od metylowanej w pozycji 7 guanozyny na 5' końcu cząsteczki (czapeczka). Jak wspomniano już wcześniej, struktura ta jest rozpoznawana w jądrze komórkowym przez kompleks dwóch białek zwany CBC (ang. *cap binding complex*) [91-93]. CBC tworzą: białko o wielkości 20 kDa oraz białko o wielkości 80 kDa. Żadne z tych białek samodzielnie nie potrafi rozpoznać struktury czapeczki, dopiero po utworzeniu heterodimeru kompleks wiąże się do 7-metyloguanozyny. Kompleks CBC odgrywa za-

sadniczą rolę w eksporcie snRNA. Przeciwciała rozpoznające CBP 20 wstrzykiwane do jądra komórkowego oocyta *Xenopus laevis* blokują eksport snRNA. Użyte w tym eksperymencie przeciwciała uniemożliwiają CBC wiązanie się do czapeczki [93].

Kompleks CBP 20/CBP 80 wiąże się również do czapeczki na końcu 5' cząsteczek mRNA. Wykazano, że CBC uczestniczy w procesie wycinania intronów z pre-mRNA, a dokładniej wpływa na wiązanie się U1 do miejsca styku 5' egzon/intron pierwszego tzw. proksymalnego względem czapeczki intronu [94]. Co więcej, towarzyszy on dojrzalemu mRNA w porach jądrowych w trakcie translokacji. Zaobserwowano, że w czasie translokacji związany z CBC koniec 5' mRNA przesuwa się jako pierwszy, „ciągnąc” za sobą całą cząsteczkę mRNA [77]. Wydaje się jednak, że w przeciwieństwie do snRNA, CBC nie odgrywa tak zasadniczej roli w eksporcie mRNA. Przeciwciała rozpoznające CBP 20, blokujące eksport snRNA, nie wpływają na transport żadnego z badanych mRNA [93]. Być może CBC uczestniczy jedynie we właściwym pakowaniu cząstek hnRNP oraz w prawidłowej lokalizacji 5' końca cząsteczek RNA. Na pewno jednak w przypadku mRNA nie stanowi głównego białka adaptorowego. Wydaje się rzeczą oczywistą, że najistotniejszą rolę w eksporcie mRNA odgrywają białka kompleksu hnRNP. Jak już wspomniano wcześniej, niektóre z tych białek kursują pomiędzy cytoplazmą i jądrem komórkowym. Łatwo sobie wyobrazić, że białka takie mogłyby również uczestniczyć w przenoszeniu RNA z jądra do cytoplazmy. Głównym kandydatem do tej funkcji jest białko A1. Wstrzyknięcie dużej ilości A1 do oocytów żaby szponiastej powoduje zahamowanie eksportu mRNA, nie powodując żadnych zakłóceń w eksporcie innych rodzajów RNA (tRNA, snRNA) [95]. W opisywanym eksperymencie obserwowano eksport mRNA reduktazy dwuhydrofolianowej (DHFR). Eksperyment ten powtórzono dla kilku innych mRNA i znaleziono również cząsteczki informacyjnego RNA, których transport z jądra do cytoplazmy nie był hamowany przez nadmiar A1. Wskazywać to może na istnienie kilku różnych białek adaptorowych uczestniczących w eksporcie mRNA. Eksport (a także import) białka A1 kompleksu hnRNP zależy od rejonu M9, który rozpoznawany jest przez transportynę — receptor importu A1. Czy transportyna uczestniczy w eksporcie mRNA? Chociaż brak jeszcze definitywnej odpowiedzi kilka danych wskazuje, że jednak nie. Dopiero jednak po wyizolowaniu i scharakteryzowaniu właściwego receptora rozpoznającego hnRNP A1 będzie można stwierdzić czy białko to jest transpor-

tyną, czy też mamy do czynienia z zupełnie nowym polipeptydem.

Ciekawych, nowych danych na temat eksportu mRNA dostarczyły badania mutantów drożdżowych o zakłóconym transporcie poli(A) RNA z jądra komórkowego do cytoplazmy. Szczególnie dwa białka drożdżowe: Mex67p i Gle1p, wydają się być bezpośrednio zaangażowane w eksport mRNA u drożdży [96-98]. Ciekawe, że oba białka zawierają funkcjonalne sygnały eksportu typu Rev. Dodatkowo wykazano, że Mex67p oddziałuje z innymi polipeptydami rozpoznającymi i wiążącymi się z RNA. Pokazano również, stosując technikę „crosslink in vivo”, że Mex67p tworzy kompleksy z drożdżowym RNA. Eksperymenty te sugerują, że w eksporcie RNA w komórkach drożdży biorą udział białka posiadające NES typu Rev. Jest to o tyle dziwne, że w oocytach żaby szponiastej białko Rev korzysta z innej niż mRNA drogi eksportu. Wyciszenie eksportu białka Rev powoduje w oocytach zahamowanie transportu 5S i snRNA [83].

IV-1.3. Receptory eksportu — eksportyny

Ostatnie lata przyniosły serię prac, w których scharakteryzowano pierwsze receptory eksportu. Białka te nazwano eksportynami. Pierwszym opisanym receptorem eksportu było białko uczestniczące w transporcie polipeptydów posiadające sygnał eksportu typu Rev. Ten długo poszukiwany czynnik okazał się białkiem scharakteryzowanym już wcześniej u drożdży *S. pombe* i nazwanym CRM1. Gen CRM1 został sklonowany w trakcie poszukiwania genów związanych z podziałem komórki, mutacje w genie CRM1 powodowały zmiany w morfologii chromosomów [99]. Wykazano, że ssaczy homolog CRM1 zasocjowany jest z porami jądroвыми wiążąc się bezpośrednio przynajmniej z jedną nukleoporyną — CAN/Nup214 [67]. Stwierdzono również, że wykazuje pewne podobieństwo do importyny β . Obserwacje te sugerowały, że być może CRM1 związany jest z transportem cząsteczek przez błonę jądrową. Sytuacja wyjaśniła się kiedy wykazano, że białka o sygnale eksportu typu Rev, wiążą się z CRM1 w obecności RanGTP, czyli dokładnie tak jak receptor eksportu w modelu wahadłowych receptorów. Dodatkowych danych dostarczyły eksperymenty wykorzystujące antybiotyk leptomycynę B. Leptomycyna B została początkowo opisana jako bardzo skuteczny środek grzybobójczy. Dokładniejsza analiza wykazała, że antybiotyk ten działa na CRM1. Wstrzyknięcie leptomycyny B do jądra oocytów żaby szponiastej powodowało zahamowanie eksportu białka Rev,

a eksperymenty *in vitro* dowiodły, że w obecności tego antybiotyku nie dochodzi do tworzenia kompleksu Rev/CRM1. Co więcej, leptomycyna B nie tylko hamowała eksport białka Rev, ale również eksport 5S rRNA i snRNA — cząsteczek wykorzystujących taką samą drogę eksportu jak białka zawierające NES. Wykonane eksperymenty wykazały, że CRM1 jest receptorem eksportu białek posiadających NES typu Rev. Zaproponowano zmianę nazwy CRM1 na eksportyna I [100, 101]. Warto w tym miejscu zauważyć, że kilka lat wcześniej opisano już białko drożdżowe wiążące się do domeny aktywującej Rev. Białko to nazwano Rip (ang. Rev interacting protein). Rip okazał się nukleoporyną dość luźno związaną z kompleksem porów jądrowych. Podobne białko wyizolowano z komórek HeLa (Rab/hRip). Początkowo sądzono, że białka te są właściwymi receptorami Rev, chociaż nigdy nie pokazano w przekonujący sposób, że wiążą się one do białka Rev *in vitro*. Dokładniejsze badania wykazały, że właściwym receptorem Rev jest jednak CRM1 (eksportyna I). Wcześniej obserwowane interakcje Rib — Rev były możliwe tylko w obecności CRM1 [102-104].

W tym samym czasie scharakteryzowano inne białko należące do grupy receptorów eksportu — CAS. CAS zidentyfikowano jako ludzki homolog drożdżowego białka Cse1p. Mutacje w genie CSE1 u drożdży *Saccharomyces cerevisiae* zakłócały proces podziału komórki, powodując nienormalną segregację chromosomów w czasie mitozy [105, 106]. Podobnie jak CRM1, CAS również wykazywał pewne podobieństwo do importyny β , szczególnie do jej regionu odpowiedzialnego za wiązanie GTPazy Ran (część N-końcowa CAS). CAS wiązał się do importyny α i to tylko w obecności RanGTP. Stosując system *in vitro* wykazano, że CAS jest niezbędny przy eksporcie importyny α z jądra komórkowego. Brak białka CAS powodował, że importyna α , uczestnicząca jak pamiętamy w imporcie białek, po jednym cyklu pozostawała w jądrze komórkowym i nie była transportowana do cytoplazmy po nowy substrat [107].

Znamy jeszcze jeden receptor eksportu — eksportynę tRNA [108, 109]. Eksportyna tRNA wiąże się bezpośrednio z cząsteczkami tRNA w obecności RanGTP. I również w tym przypadku scharakteryzowany receptor wykazuje pewne, choć niewielkie, podobieństwo do importyny β . Eksportyna tRNA wykazuje podobieństwo do drożdżowego białka Los1p. Gen *LOS1* oraz gen syntazy pseudourydynowej *PUS1* zostały sklonowane podczas poszukiwania białek oddziałujących z nukleoporyną Nsp1p [110].

Wydaje się, że wśród białek należących do rodziny importyny należy spodziewać się jeszcze wielu nowych receptorów eksportu.

V. Regulacja importu i eksportu

Na koniec warto przedstawić kilka wybranych przykładów regulacji transportu między jądrem komórkowym i cytoplazmą.

Wspomniany wcześniej inhibitor zależnej od cyklicznego AMP kinazy białek, PKI, posiada sygnał eksportu z jądra komórkowego typu Rev. Zależna od cyklicznego AMP kinaza białek PKA występuje w komórkach nie pobudzonych w postaci nieaktywnego kompleksu czterech podjednostek (heterotetramer): dwóch katalitycznych (C) oraz dwóch regulatorowych (R). Po pobudzeniu komórki kompleks rozpada się umożliwiając podjednostkom C dyfuzję do jądra komórkowego, gdzie fosforylują specyficzne białkowe substraty. PKI jest niewielkim białkiem, które wiąże się z katalityczną podjednostką C i, dzięki swojemu sygnałowi NES, transportuje ją do cytoplazmy. Gwarantuje to, że podjednostka katalityczna znajduje się na terenie jądra komórkowego krótko i po fosforylacji odpowiednich białek, czyli wykonaniu swojego zadania, szybko powraca do cytoplazmy [86, 111, 112].

Drożdżowe białko Swi5p jest zaangażowane w ekspresję endonukleazy odpowiedzialnej za zmianę typu koniugacyjnego (α, α) drożdży. Białko to w fazie cyklu komórkowego G1 znajduje się w jądrze komórkowym. W pozostałych fazach cyklu komórkowego Swi5p zlokalizowane jest w cytoplazmie. Scharakteryzowano 50 aminokwasowy motyw w Swi5p odpowiedzialny za zależną od fazy cyklu komórkowego lokalizację białka. Segment ten posiada dwuelementowy (ang. *bipartite*) NLS oraz dwie reszty serynowe, które mogą ulegać fosforylacji. Fosforylacja seryn w tym rejonie powoduje, że sygnał NLS Swi5p jest nieaktywny i białko pozostaje w cytoplazmie. Brak reszt fosforanowych uaktywnia sygnał lokalizacji jądrowej i białko wędruje do jądra komórkowego [113].

U kręgowców opisano rodzinę białek NF-AT, których funkcją jest aktywacja określonych genów w komórkach układu odpornościowego. Chociaż w komórkach nie pobudzonych białka te mają zdolność wiązania się do odpowiednich sekwencji DNA i aktywacji transkrypcji, nie mogą wpływać na ekspresję genów, ponieważ znajdują się w cytoplazmie. Dopiero wzrost stężenia wapnia wewnątrz komórki uaktywnia fosfatazę — kalcyneurynę, która usuwa fosforany z reszt serynowych NF-AT. Defosforylacja

pozwała na transport NF-AT z cytoplazmy do jądra komórkowego („odsłania” NLS) i umożliwia aktywację odpowiednich genów. Co więcej, kalcyneuryna wędruje również do jądra komórkowego zabezpieczając białka NF-AT przed ponowną fosforylacją przez jądrową kinazę [114-116].

U drożdży geny związane z metabolizmem fosforanów podlegają regulacji w zależności od dostępności fosforanów w pożywce. Białko Pho4p jest aktywatorem ekspresji genów, które aktywne są tylko przy braku fosforanów w podłożu. Pho4p w postaci ufosforylowanej znajduje się w cytoplazmie, czyli w przedziale komórkowym w którym nie może pełnić swojej funkcji aktywatora transkrypcji. Na terenie jądra komórkowego Pho4p może przebywać tylko w postaci nie ufosforylowanej. Uważa się obecnie, że fosforylacja Pho4p zależy od kompleksu cykliny Pho80p i zależnej od cykliny kinazy Pho85p. Kompleks Pho80p/Pho85p znajduje się w jądrze komórkowym, a aktywowany jest jeżeli komórki znajdują się w pożywce zawierającej nieorganiczny fosforan. Prowadzi to do fosforylacji aktywatora Pho4p co powoduje jego szybki eksport z jądra komórkowego do cytoplazmy [117].

Aktywność wielu czynników transkrypcyjnych regulowana jest przez ich retencję cytoplazmatyczną. Najczęściej tworzą one w cytoplazmie kompleksy z inhibitorami polipeptydowymi i w takiej formie nie zdolne są do wędrówki do jądra komórkowego. Chyba najlepiej scharakteryzowany przykład to regulacja aktywności czynnika transkrypcyjnego NFκB. NFκB zbudowany jest z dwóch podjednostek: p50 i p65. Jeżeli podjednostki te zwiążą się z IκBα to utworzony kompleks pozostaje w cytoplazmie. Fosforylacja określonej reszty tyrozynowej w IκBα powoduje jego dysocjację od NFκB. Może również dojść do fosforylacji dwóch reszt serynowych w IκBα. Fosforylacja jest sygnałem do ubiquitynacji, co dalej powoduje degradację inhibitora przez proteasom i uwolnienie NFκB. Uwolniony czynnik transkrypcyjny bez przeszkód wędruje do jądra komórkowego [118-120].

Innymi czynnikami, których aktywność sterowana jest poprzez lokalizację subkomórkową są np.: receptor glikokortykoidowy u ssaków [121], czy czynnik transkrypcyjny szoku cieplnego u muszki owocowej [122]. W obu przypadkach za cytoplazmatyczną retencję odpowiedzialne są specyficzne białka inhibitorowe.

Wszystkie opisane do tej pory przykłady dotyczyły regulacji transportu białek. Znamy również przypadki regulacji eksportu RNA. U drożdży wiadomo, że inkubacja komórek w 42°C powoduje

wstrzymanie eksportu poli(A)⁺RNA. Niektóre mRNA, np. takie jak mRNA białek szoku cieplnego, muszą jednak przedostawać się do cytoplazmy. Dokładniej przebadano mRNA kodowane przez SSA4 i okazało się, że ten hs mRNA zawiera co najmniej dwa elementy w swojej sekwencji, które pozwalają mu na eksport w warunkach zahamowania eksportu większości mRNA. Elementy te przeniesione do innego mRNA pozwalają mu na transport pomimo, że nie jest to mRNA białka szoku cieplnego. Nie do końca rozumiemy jak eksportowane są hs mRNA. Badania wykazały, że eksport ten przebiega bez zakłóceń nawet wtedy, gdy uszkodzone są geny białek niezbędnych do transportu innych rodzajów cząsteczek. Mutacje w genach kodujących białka Gsp1p (Ran), Prp20p (RCC1) i Rna1p (RanGAP1) nie powodują zaburzeń w eksporcie mRNA białek szoku cieplnego [123, 124]. Prowadzone są obecnie intensywne badania nad szlakiem eksportu mRNA białek szoku cieplnego w komórkach drożdży.

VI. Uwagi końcowe

Transport białek i RNA pomiędzy jądrem komórkowym a cytoplazmą to temat niezwykle ciekawy, będący w centrum zainteresowania wielu czołowych grup badawczych. I chociaż wiemy już sporo o jądrowo-cytoplazmatycznym transporcie makrocząsteczek, to ciągle na odpowiedź czekają podstawowe pytania dotyczące tego procesu np. o mechanizm translokacji wewnątrz pora jądrowego. Nadchodzące lata, dzięki bardzo intensywnym badaniom, na pewno dostarczą nowych danych, które pozwolą na lepsze zrozumienie w jaki sposób makrocząsteczki przemieszczają się przez otoczkę jądrową.

Podziękowania

Praca została zrealizowana w ramach projektu grantowego KBN nr 6P04A03511

*Artykuł otrzymano 1 lutego 1999 r.
Zaakceptowano do druku 12 lipca 1999 r.*

Piśmiennictwo

1. Görlich D, Mattaj JW (1996) *Science* **271**: 1513-1518.
2. Izaurralde E, Adam S (1998) *RNA* **4**: 351-364.
3. Wilson KL, Wiese C (1996) *Semin Cell Dev Biol* **7**: 487-496.
4. Feldherr CM, Akin D (1990) *Electron Microsc Rev* **3**: 73-86.
5. Reichelt R, Holzenburg A, Buhle EL Jr, Jarnik M, Engel A, Aebi U (1990) *J Cell Biol* **110**: 883-894.
6. Panté N, Bastos R, McMorrow J, Burke B, Aebi U (1994) *J Cell Biol* **126**: 603-617.

7. Goldberg MW, Allen TD (1995) *Curr Opin Cell Biol* **7**: 301-309.
8. Panté N, Aebi U (1995) *J Cell Sci* (suppl.) **19**: 1-11.
9. Hinshaw JE, Carragher BO, Milligan RA (1992) *Cell* **69**: 1133-1141.
10. Akey CW, Radermacher M (1993) *J Cell Biol* **122**: 1-19.
11. Davis LI (1995) *Annu Rev Biochem* **64**: 865-896.
12. Rout MP, Blobel G (1993) *J Cell Biol* **123**: 771-783.
13. Bastos R., Panté N, Burke B (1995) *Int Rev Cytol* **162B**: 257-302.
14. Doye V, Hurt E (1997) *Current Opinion in Cell Biology* **9**: 401-411.
15. Hu T, Guan T, Gerace L (1996) *J Cell Biol* **134**: 589-601.
16. Bastos R, Lin A, Enarson M, Burke B (1996) *J Cell Biol* **134**: 1141-1156.
17. Powers MA, Forbers DJ, Dahlberg JE, Lund E (1997) *J Cell Biol* **136**: 241-250.
18. Kalderon D, Roberts BL, Richardson WD, Smith AE (1984) *Cell* **39**: 499-509.
19. Robbins J, Dilworth SM, Laskey RA, Dingwall C (1991) *Cell* **64**: 615-23.
20. Pollard VW, Michael WM, Nakielny S, Siomi MC, Wang F, Dreyfuss G (1996) *Cell* **86**: 985-994.
21. Fridell RA, Truant R, Thorne L, Benson RE, Cullen BR (1997) *J Cell Sci* **110**: 1325-1331.
22. Siomi H, Dreyfuss G (1995) *J Cell Biol* **129**: 551- 560.
23. Weighardt F, Biamonti G, Riva S (1995) *J Cell Sci* **108**: 545-555.
24. Michael WM, Eder PS, Dreyfuss G (1997) *EMBO J* **16**: 3587-3598.
25. Moreland RB, Nam HG, Hereford LM, Fried HM (1985) *Proc Natl Acad Sci USA* **82**: 6561-6565.
26. Schaap PJ, van't Riet J, Woldringh CL, Raue HA (1991) *J Mol Biol* **221**: 225-237.
27. Schmidt C, Lipsius E, Kruppa J (1995) *Mol Biol Cell* **6**: 1875-1885.
28. Quayle IK, Toku S, Tanaka T (1996) *Eur J Cell Biol* **69**: 151-155.
29. Russo G, Ricciardelli G, Pietropaolo C (1997) *J Biol Chem* **272**: 5229-5235.
30. Underwood MR, Fried HM (1990) *EMBO J* **9**: 91-99.
31. Mattaj IW (1988) W: ML Birnstiel (red) *U snRNP assembly and transport*, Berlin:Springer Verlag, str 100-114.
32. Jarmolowski A, Mattaj IW (1993) *EMBO J* **12**: 223-232.
33. Branlant C, Krol A, Ebel JP, Lazar E, Bernard H, Jacobs M (1982) *EMBO J* **7**: 1259-1265.
34. Liautard J-P, Sri-Widada J, Brunel C, Jeanteur P (1982) *J Mol Biol* **162**: 623-643.
35. Mattaj IW, De Robertis EM (1985) *Cell* **40**: 111-118.
36. Lührmann R, Kastner B, Bach M (1990) *Biochim Biophys Acta* **1087**: 265-292.
37. Mattaj IW (1986) *Cell* **46**: 905-911.
38. Hamm J, Darzynkiewicz E, Tahara SM, Mattaj IW (1990) *Cell* **62**: 569-577.
39. Fischer U, Lührmann R (1990) *Science* **249**: 786-790.
40. Fischer U, Sumpter V, Sekine M, Satoh T, Lührmann R (1993) *EMBO J* **12**: 573-583.
41. Palacios I, Hetzer M, Adam S.A., Mattaj IW (1997) *EMBO J* **16**: 6783-6792.
42. Newmeyer DD, Lucocq JM, Burglin TR, De Robertis EM (1986) *EMBO J* **5**: 501-510.
43. Newmeyer DD, Finlay DR, Forbes DJ (1986) *J Cell Biol* **103**: 2091-2102.
44. Adam SA, Marr RS, Gerace L (1990) *J Cell Biol* **111**: 807-816.
45. Adam EJJ, Adam SA (1994) *J Cell Biol* **125**: 547-555.
46. Görlich D, Kostka S, Kraft R, Laskey RA, Hartmann E (1995) *Curr Biol* **5**: 383-392.
47. Moore MS, Blobel G (1993) *Nature* **365**: 661-663.
48. Melchior F, Paschal B, Evans E, Gerace L (1993) *J Cell Biol* **123**: 1649-1659.
49. Corbett AH, Koeppe DM, Schlenstedt G, Lee MS, Hopper AK, Silver PA (1995) *J Cell Biol* **130**: 1017-1026.
50. Moore MS, Blobel G (1994) *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 10212-10216.
51. Paschal BM, Gerace L (1995) *J Cell Biol* **129**: 925-937.
52. Görlich D, Vogel F, Mills AD, Hartmann E, Laskey RA (1995) *Nature* **377**: 246-248.
53. Weis K, Mattaj IW, Lamond AI (1995) *Science* **268**: 1049-1053.
54. Görlich D, Henklein P, Laskey RA, Hartmann E (1996) *EMBO J* **15**: 1810-1817.
55. Weis K, Ryder U, Lamond A (1996) *EMBO J* **15**: 1810-1817.
56. Moroianu J, Hijikata M, Blobel G, Radu A (1995) *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 6532-6536.
57. Görlich D (1997) *Curr Opin Cell Biol* **9**: 412-419.
58. Koeppe DM, Silver PA (1996) *Cell* **87**: 1-4.
59. Ohtsubo M, Okazaki H, Nishimoto T (1989) *J Cell Biol* **109**: 1389-1397.
60. Görlich D, Panté N, Kutay U, Aebi U, Bischoff FR (1996) *EMBO J* **15**: 5584-5594.
61. Nehrbass U, Fabre E, Dihlmann S, Herth W, Hurt EC (1993) *Eur J Cell Biol* **62**: 1-12.
62. Rout MP, Blobel G, Aitchison JD (1997) *Cell* **89**: 715-725.
63. Schlenstedt G, Smirnova E, Deane R, Solsbacher J, Kutay U, et al. (1997) *EMBO J* **16**: 6237-6249.
64. Deane R, Schäfer W, Zimmermann HP, Mueller L, Görlich D, et al. (1997) *Mol Cell Biol* **17**: 5087-5096.
65. Fischer U, Darzynkiewicz E, Tahara SM, Dathan NA, Lührmann R, Mattaj IW (1991) *J Cell Biol* **113**: 705-714.
66. Huber J, Marshallsay C, Crontzhausen U, Sekine M, Lührmann R (1998) *EMBO J* **17**: 4114-4126.
67. Fornerod M, van Deursen J, van Baal S, Reynolds A, Davis D, et al. (1997) *EMBO J* **16**: 807-816.
68. Zaslouff M (1983) *Proc Natl Acad Sci USA* **80**: 6436-6440.
69. Bataillé N, Helser T, Fried HM (1990) *J Cell Biol* **111**: 1571-1582.
70. Pokrywka NJ, Goldfarb DS (1995) *J Biol Chem* **270**: 3619-3624.
71. Jarmolowski A, Boelens WC, Izaurralde E, Mattaj IW (1994) *J Cell Biol* **124**: 627-635.
72. Boelens WC, Palacios I, Mattaj IW (1995) *RNA* **1**: 273-283.
73. Legrain P, Rosbash M (1989) *Cell* **57**: 573-583.
74. Ohno M, Shimura Y (1996) *Genes Dev* **10**: 997-1007.
75. Alzhanova-Ericsson AT, Sun X, Visa N, Kiseleva E, Wurtz T, Daneholt B (1996) *Genes Dev* **10**: 2881-2893.
76. Visa N, Alzhanova-Ericsson AT, Sun X, Kiseleva E, Björkroth B, et al. (1996) *Cell* **84**: 253-264.
77. Visa N, Izaurralde E, Ferreira J, Daneholt B, Mattaj IW (1996) *J Cell Biol* **133**: 5-14.
78. Nakielny S, Dreyfuss G (1996) *J Cell Biol* **134**: 1365-1373.
79. Malim MH, Hauber J, Le SY, Maizel JV, Cullen BR (1989) *Nature* **338**: 254-257.
80. Zapp ML, Green MR (1989) *Nature* **342**: 714-716.
81. Saavedra C, Felber B, Izaurralde E (1997) *Curr Biol* **7**: 619-628.
82. Bray M, Prasad S, Dubay JW, Hunter E, Jeang KT, Rekosh D, Hammarskjöld ML (1994) *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 1256-1260.
83. Fischer U, Meyer S, Teufel M, Heckel C, Lührmann R, Rautmann G (1994) *EMBO J* **13**: 4105-4112.
84. Fischer U, Huber J, Boelens WC, Mattaj IW, Lührmann R (1995) *Cell* **82**: 475- 483.
85. Guddat V, Bakken AH, Pieler T (1990) *Cell* **60**: 619-628.
86. Wen W, Meinkoth JL, Tsien RY, Taylor SS (1995) *Cell* **82**: 463-473.
87. Fritz CC, Green MR (1996) *Curr Biol* **6**: 848-854.
88. Richards S.A., Lounsbury KM, Carey KL, Macara IG (1996) *J Cell Biol* **134**: 1157-1168.

89. Zolotukhin AS, Felber BK (1997) *J Biol Chem* **272**: 11356-11360.
90. Fukuda M, Gotoh I, Gotoh Y, Nishida E (1996) *J Biol Chem* **271**: 20024-20028.
91. Izaurralde E, Lewis J, McGuigan C, Jankowska M, Darzynkiewicz E, Mattaj IW (1994) *Cell* **78**: 657-668.
92. Izaurralde E, Stepiński J, Darzynkiewicz E, Mattaj IW (1992) *J Cell Biol* **118**: 1287-1295.
93. Izaurralde E, Lewis J, Gamberi C, Jarmołowski A, McGuigan C, Mattaj IW (1995) *Nature* **376**: 709-712.
94. Lewis JD, Izaurralde E, Jarmołowski A, McGuigan C, Mattaj IW (1996) *Genes Dev* **10**: 1683-1698.
95. Izaurralde E, Jarmołowski A, Beisel C, Mattaj IW, Dreyfuss G (1997) *J Cell Biol* **132**: 27-35.
96. Murphy R, Wentz SR (1996) *Nature* **383**: 357-360.
97. Del Priore V, Snay CA, Bahr A, Cole CN (1996) *Mol Biol Cell* **7**: 1601-1621.
98. Segref A, Sharma K, Doye V, Hellwig A, Huber J, et al. (1997) *EMBO J* **16**: 3256-3271.
99. Adachi Y, Yanagida M (1989) *J Cell Biol* **108**: 1195-1207.
100. Fornerod M, Ohno M, Yoshida M, Mattaj IW (1997) *Cell* **90**: 1051-1060.
101. Stade K, Ford CS, Guthrie C, Weis K (1997) *Cell* **90**: 1041-1050.
102. Stutz F, Neville M, Rosbash M (1995) *Cell* **82**: 495-506.
103. Bogerd HP, Fridell RA, Madore S, Cullen BR (1995) *Cell* **82**: 485-94.
104. Fritz CC, Zapp ML, Green MR (1995) *Nature* **376**: 530-533.
105. Xiao Z, McGrew JT, Schroeder AJ, Fitzgerald-Hayes M (1993) *Mol Cell Biol* **13**: 4691-4702.
106. Brinkmann U, Brinkmann E, Gallo M, Pastan I (1995) *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 10427-10431.
107. Kutay U, Bischoff FR, Kostka S, Kraft R, Görlich D (1997) *Cell* **90**: 1061-1071.
108. Artrs GJ, Fornerod M, Mattaj IW (1998) *Curr Biol* **8**: 305-314.
109. Kutay U, Lipowsky G, Izaurralde E, Bischoff FR, Schwarzmaier P, Hartman E, Görlich D (1998) *Mol Cell* **1**: 359-369.
110. Simos G, Tekotte H, Grosjean H, Segref A, Sharma K, et al. (1996) *EMBO J* **15**: 2270-2284.
111. Nigg EA, Hilz H, Eppenberger HM, Dutly F (1985) *EMBO J* **4**: 2801-2806.
112. Harootunian AT, Adams SR, Wen W, Meinkoth JL, Taylor SS, Tsien RY (1993) *Mol Biol Cell* **4**: 993-1002.
113. Moll T, Tebb G, Surana U, Robitsch H, Nasmyth K (1991) *Cell* **66**: 743-758.
114. Beals CR, Clipstone NA, Ho SN, Crabtree GR (1997) *Genes Dev* **11**: 824-834.
115. Timmerman LA, Clipstone NA, Ho SN, Northrop JP, Crabtree GR (1996) *Nature* **383**: 837-840.
116. Shibasaki F, Price ER, Milan D, McKeon F (1996) *Nature* **382**: 370-373.
117. O'Neill EM, Kaffman A, Jolly ER, O'Shea EK (1996) *Science* **271**: 209-212.
118. Henkel T, Zabel U, van Zee K, Muller JM, Fanning E, Baeuerle PA (1992) *Cell* **68**: 1121-1133.
119. Imbert V, Rupec RA, Livolsi A, Pahl HL, Traenckner EBM, et al. (1996) *Cell* **86**: 787-798.
120. Traenckner EBM, Pahl HL, Henkel T, Schmidt KN, Wilk S, Baeuerle PA (1995) *EMBO J* **14**: 2876-2883.
121. Yamamoto KR (1995) *Harvey Lect.* **91**: 1-19.
122. Zandi E, Tran TNT, Chamberlain W, Parker CS (1997) *Genes Dev* **11**: 1299-1314.
123. Saavedra CA, Hammell CM, Heath CV, Cole CN (1997) *Genes Dev* **11**: 2845-2856.
124. Saavedra C, Tung KS, Amberg DC, Hopper AK, Cole CN (1996) *Genes Dev* **10**: 1608-1620.

Znaczenie trombomoduliny w regulacji krzepnięcia i fibrynolizy

Significance of thrombomodulin in the regulation of coagulation and fibrinolysis

MAGDALENA BONCLER¹, CEZARY WATAŁA²

Spis treści:

- I. Wprowadzenie
- II. Występowanie trombomoduliny w ustroju
- III. Struktura i funkcje trombomoduliny
 - III-1. Budowa cząsteczki
 - III-2. Znaczenie trombomoduliny w regulacji aktywacji białka C
 - III-3. Udział trombomoduliny w regulacji fibrynolizy
- IV. Polimorfizmy genetyczne oraz regulacja ekspresji genu trombomoduliny
- V. Uwagi końcowe

Contents:

- I. Introduction
- II. The occurrence of thrombomodulin
- III. Structure and function of thrombomodulin
 - III-1. Thrombomodulin molecule structure
 - III-2. Significance of thrombomodulin in the regulation of protein C activation
 - III-3. Role of thrombomodulin in fibrinolysis
- IV. Genetic polymorphisms and the regulation of thrombomodulin gene expression
- V. Concluding remarks

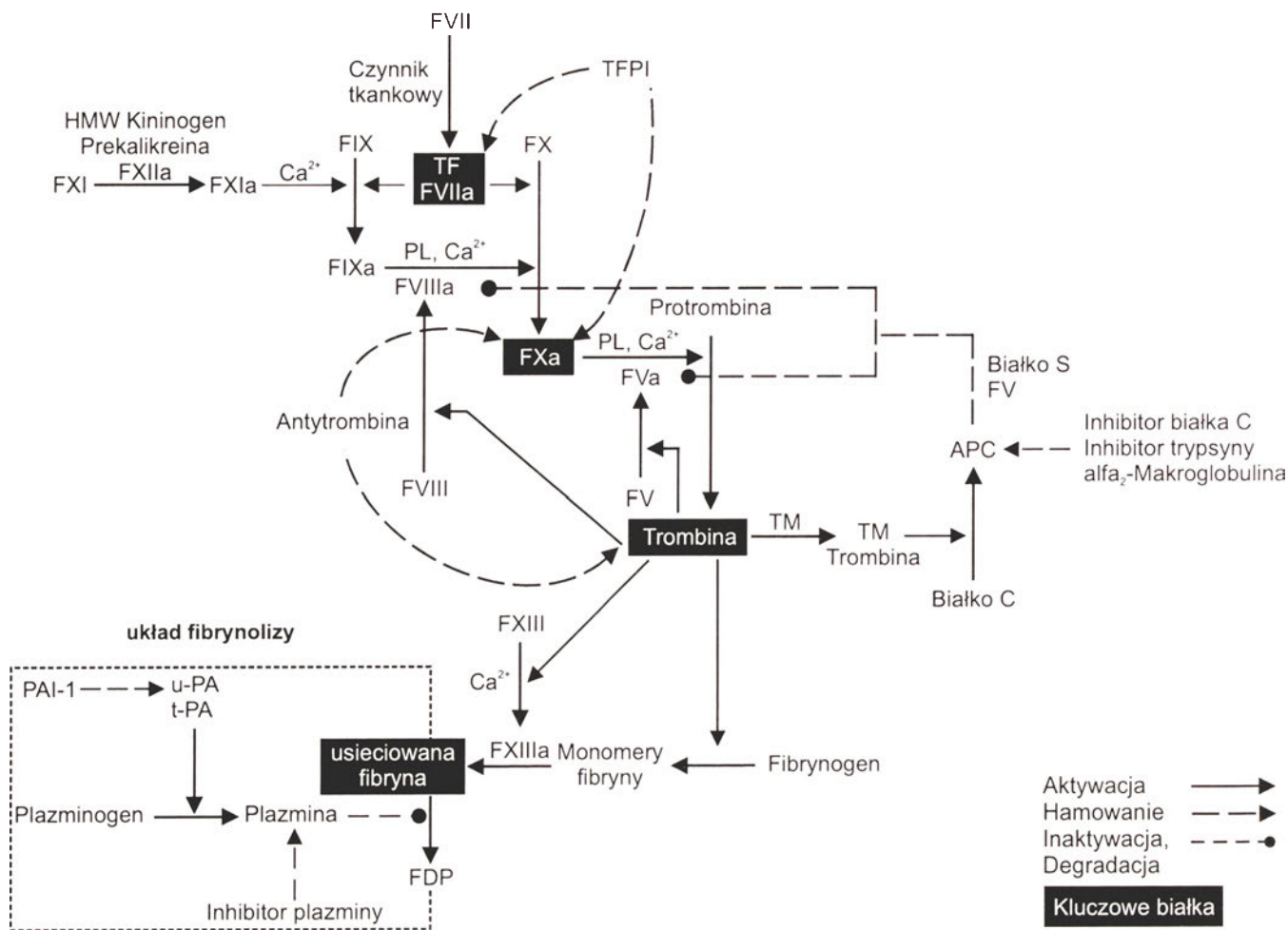
Wykaz stosowanych skrótów: TM — trombomodulina; APC — aktywowane białko C; Gla — kwas γ -karboksylglutaminowy; ATIII — antytrombina III; HCII — kofaktor II heparyny; PCI — inhibitor białka C; TAFI (pro-pCPB) — prokarboksypeptydaza B, inhibitor fibrynolizy (z ang. *Thrombin Activatable Fibrinolysis Inhibitor*); TAFIa (pCPB) — aktywna forma TAFI (karboksypeptydaza B); cAMP — cykliczny adenozynomonofosforan; TNF — czynnik martwicy nowotworów (z ang. *Tumor Necrosis Factor*); TGF — transformujący czynnik wzrostu (z ang. *Transforming Growth Factor*); DIC — zespół wykrzepiania śródnaczyniowego; ARDS — zespół zaburzeń oddechowych typu dorosłych; APCR — oporność na aktywowane białko C (z ang. *Activated Protein C Resistance*); rhsTM — rekombinantowa ludzka trombomodulina; TF — czynnik tkankowy; PL — fosfolipidy błon komórkowych; HMW kininogen – wysokocząsteczkowy kininogen; FDP – produkty degradacji fibrynogeny/fibryny; TFPI – inhibitor czynnika tkankowego (z ang. *Tissue Factor Pathway Inhibitor*)

I. Wprowadzenie

Właściwe funkcjonowanie układu hemostazy opiera się na utrzymywaniu równowagi między procesami krzepnięcia, procesami antykoagulacji i pro-

cesami fibrynolizy. Jakikolwiek zachwianie takiej równowagi prowadzić może w konsekwencji do nasilenia lub zahamowania trombinogenezy czyli do zmian ilości wytwarzanej i dostępnej w krwiobiegu trombiny, kluczowego białka „kaskady” krzepnięcia. Proces powstawania zakrzepu, którego kulminacją jest wytworzenie nierozpuszczalnego włókna, obejmuje szereg reakcji enzymatycznych, na drodze których nieaktywne formy osoczowych czynników krzepnięcia oraz nieaktywne kofaktory (takie jak czynnik V i VIII) są przekształcane w aktywne proteazy serynowe oraz aktywne kofaktory enzymów (Va, VIIIa). Aktywacja proteaz serynowych biorących udział w wytwarzaniu włókna uruchamia również mechanizm aktywacji krwinek płytkowych. Powoduje to zaistnienie stanu nadkrzepliwości we wszystkich tych przypadkach, kiedy zawodzą mechanizmy regulacyjne kaskady krzepnięcia. Towarzyszą temu zwykle także dysfunkcje układu fibrynolitycznego, któremu coraz częściej przypisuje się również rolę sterownika procesu trombinogenezy [1]. W warunkach normalnych *in vivo* całością reakcji hemostazy, obejmującej z jednej strony generację trombiny i tworzenie zakrzepu, z drugiej zaś szybkie usuwanie niepożądanych zakrzepów i zatorów, a tym samym udrażnianie światła naczyń krwionośnych (przywracanie normalnych warunków przepływu krwi), pozo-

¹Mgr, ²dr hab. Samodzielna Pracownia Zaburzeń Krzepnięcia Krwi, Katedra Diagnostyki Laboratoryjnej, Akademia Medyczna, ul. Narutowicza 96, 90-141 Łódź, email: mboncler@psk2.am.lodz.pl



Ryc. 1. Schemat kaskady krzepnięcia krwi ukazujący połączone ze sobą trzy szlaki reakcji proteolitycznych związanych z aktywacją układu krzepnięcia, układu fibrynolizy oraz układu antykoagulacyjnego. W tworzeniu na powierzchni fosfolipidów błon płytek krwi (PL) kompleksu protrombinazy z aktywnym czynnikiem Xa, oraz powstawaniu kluczowego białka układu krzepnięcia – trombiny, uczestniczy kilkanaście białek osocza, z których większość występuje w formie zymogenów proteaz serynowych, a część, jak na przykład wysokocząsteczkowy kininogen (HMW kininogen), funkcjonuje jako kofaktor przyspieszający przekształcenie osoczowych czynników krzepnięcia (F) w ich aktywne postaci (Fa). Trombina odpowiada za ograniczoną proteolizę fibrynogenu, prowadząc do polimeryzacji monomerów fibryny, a także za aktywację układu fibrynolitycznego, którego zadaniem jest usuwanie utworzonego skrzepu na drodze trawienia fibryny i fibrynogenu; wiąże się to z uwalnianiem produktów ich degradacji (FDP). W niskich stężeniach trombina tworzy kompleksy z trombomoduliną (TM) na powierzchni komórek śródbłonna i prowadzi do aktywacji kluczowego składnika układu antykoagulacyjnego – aktywowanego białka C (APC). Przeciwwązkopowa rola białka C wynika z enzymatycznej proteolizy czynników Va i VIIIa w obecności kofaktora aktywowanego białka C – białka S. Naturalną barierą dla działania licznych proteaz serynowych układu krzepnięcia stanowią także inne białka inhibitorowe, takie jak np. inhibitor czynnika tkankowego (TFPI), jednakże największe znaczenie przypisuje się antytrombinie III. Strzałkami oznaczono kierunek zachodzących przemian wiodących do uaktywniania białka (linia ciągła) lub hamowania tego procesu (linia przerywana). Linia przerywana zakończona kropką wskazuje na proces inaktywacji lub degradacji białka. Kluczowe białka kaskady krzepnięcia przedstawiono w ciemnych polach.

staje pod kontrolą dwóch zasadniczych mechanizmów regulacyjnych:

a/ układu antykoagulacyjnego (przeciwzkrzepowego), który obejmuje inhibitory aktywnych proteaz serynowych (takich jak np. ATIII) oraz inhibitory aktywnych form nieenzymatycznych kofaktorów (takich jak białko C czy białko S), oraz

b/ układu fibrynolitycznego, odpowiedzialnego m.in. za rozpuszczanie włókien i udrażnianie światła naczyń krwionośnych.

W obecności białka S aktywowane białko C hamuje proces krzepnięcia krwi na drodze proteolitycznego rozkładu czynników Va oraz VIIIa, kofaktorów niezbędnych do aktywowania kompleksu protrombinazy i uruchomienia szlaku wytwarzania trombiny

(Ryc. 1). Brak aktywowanego białka C prowadzi do niekontrolowanego wytwarzania trombiny oraz nasila prokoagulacyjną aktywność układu hemostazy. Z drugiej strony, hydroliza białka C do jego aktywnej formy zachodzi przy udziale śladowych ilości trombiny. Takie wspomagające dla układu antykoagulacyjnego działanie trombiny, kluczowego enzymu „kaskady” krzepnięcia, nazwano „paradoksem trombiny”. Na tym właśnie etapie niskie stężenia trombiny działają „paradoksalnie”, przeciwstawiając się niejako prokoagulacyjnym szlakom wytwarzania włókienka. Z ewolucyjnego punktu widzenia taka mała specyficzność substratowa trombiny nie jest niczym niezwykłym; podobną charakterystykę posiadają także inne proteazy serynowe osocza [1, 2].

Ogólnie, prawidłowe funkcjonowanie układu białka C (aktywowane białko C, jego kofaktor – białko S oraz podatny na hydrolizę substrat, np. czynnik Va) jest niezwykle istotne w utrzymywaniu równowagi układu hemostazy [3-5]. Z uwagi na silne właściwości antykoagulacyjne białka C, przejawiające się jego zdolnością do proteolitycznej degradacji prozkrzepowych białek kaskady krzepnięcia, tj. czynnika Va i VIIIa, proces aktywacji białka C przeciwdziała nadmiernej generacji trombin. Odkrycie genetycznych nieprawidłowości niektórych białek układu antykoagulacyjnego sprawiło, że zaczęto poszukiwać związku między polimorfizmami genetycznymi a dysfunkcjami układu antykoagulacyjnego oraz wskazywać na znaczenie takich polimorfizmów jako potencjalnych czynników ryzyka żylnej choroby zakrzepowo-zatorowej. W latach 90-tych zwrócono bliższą uwagę na kofaktorowe białko ekspozowane głównie na powierzchni komórek śródbłonna, które odpowiada za regulację procesu aktywacji białka C i które nazwano trombomoduliną (TM) [6, 7]. Przez analogię do wykrytych wcześniej genetycznych polimorfizmów składników układu białka C, opisane polimorfizmy w genie cząsteczki trombomoduliny, oraz ich potencjalny związek ze zmianami struktury i/lub funkcji TM, rozpatruje się ostatnio w kontekście dodatkowych czynników ryzyka choroby zakrzepowo-zatorowej [8].

II. Występowanie trombomoduliny w ustroju

W organizmie człowieka trombomodulina występuje w największej ilości na powierzchni komórek śródbłonna naczyń (w mikrokrążeniu stężenie TM sięga około 500 nmol/L). Poza tym, białko to występuje w komórkach naczyń limfatycznych, łożyska, jak również w megakariocytach, płytkach krwi, monocytach, makrofagach, neutrofilach, oraz komórkach mięśni gładkich [9].

Synteza trombomoduliny podlega wpływom różnych czynników. Do związków zwiększających syntezę trombomoduliny należą liczne czynniki chemiczne, takie jak cAMP, kwas retinowy, histamina, interleukina-4, defibrotid (pochodna polidezoksyrybonukleinowa o aktywności profibrynolitycznej i przeciwzakrzepowej), homocysteina i trombina, jak również czynniki fizyczne, takie jak np. wstrząs termiczny czy siły ścinające [10-15]. Co ciekawe, zarówno homocysteina jak i trombina wpływają na nasilenie syntezy mRNA trombomoduliny. Homocysteina wpływa także na obniżenie aktywności trombomoduliny jako kofaktora w procesie aktywacji

białka C przez trombinę na powierzchni komórek śródbłonna [16, 17].

III. Struktura i funkcje trombomoduliny

III-1. Budowa cząsteczki

Ludzka trombomodulina (TM) jest jednołańcuchową glikoproteiną zbudowaną z 557 aminokwasów. W cząsteczce trombomoduliny wyróżnia się pięć domen strukturalnych: 1) zewnątrzkomórkową domenę lektynową (reszty aminokwasowe 1-226), zawierającą fragment o budowie homologicznej ze strukturą pierwszorzędową domen lektynowych immunoglobulin IgE czy białek z rodziny selektyn (reszty 1-154), 2) domenę obejmującą sześć następujących po sobie powtórzeń sekwencji homologicznej ze strukturą naskórkowego czynnika wzrostu (z ang. *Epidermal Growth Factor*), 3) domenę obfitującą w reszty seryny i treoniny, 4) domenę transbłonową oraz 5) krótki C-końcowy odcinek cytoplazmatyczny. W obrębie domeny lektynowej oraz domen typu EGF znajduje się kilka miejsc N-glikozylacji, zaś w regionie bogatym w reszty serynowe i treoninowe przyłączone są wiązania O-glikozydowymi cząsteczki oligosacharydów. Ponadto, w węglowodanowym obszarze białka, wykazano obecność proteoglikanu — siarczanu chondroityny (w 18% populacji komórek śródbłonna z żyły pępkowej oraz w 34% populacji komórek z ludzkiej aorty, pochodzących z hodowli tkankowych). Z punktu widzenia antykoagulacyjnych własności trombomoduliny szczególne znaczenie mają odcinki czwarty, piąty i szósty w domenie typu EGF, obejmujące miejsce wiązania trombin. O ile pierwszy i ostatni z wymienionych odcinków są niezbędne do samego 'wiązania' trombin, obecność czwartego segmentu domeny EGF, a także niewielkiego odcinka aminokwasowego w domenie trzeciej, decyduje o aktywności trombomoduliny jako kofaktora. Stabilizację kompleksu trombina-trombomodulina zapewnia cząsteczka siarczanu chondroityny, która przypuszczalnie oddziałuje z dodatnio naładowanym fragmentem trombin, określanym jako II miejsce wiążące aniony (ang. *anion binding exosite II*) [18-21].

III-2. Znaczenie trombomoduliny w regulacji procesu aktywowania białka C

Efektywność działania samej trombin w aktywowaniu białka C na powierzchni fosfolipidowej dwu-

warstwy błon komórkowych płytek krwi jest stosunkowo niewielka. W obecności kompleksu trombina-trombomodulina proces aktywowania białka C zachodzi ok. 1000 razy szybciej ($K_d \approx 0.2$ nM). W tych warunkach trombina wykazuje jedynie minimalną aktywność proteolityczną w stosunku do innych białek będących jej substratami (nie dotyczy to czynnika XI). Reakcja wymaga obecności jonów Ca^{++} , które są wiązane przez reszty kwasu γ -karboksylglutaminowego (Gla) w cząsteczce białka C. Obecność fosfolipidów błonowych wpływa na przyspieszenie procesu aktywacji białka C [21]. Właściwości antykoagulacyjne aktywowanego białka C (APC), tzn. jego zdolność do proteolitycznej inaktywacji czynników Va i VIIIa, wzmagają dwa białka osocza: białko S i czynnik V, działające synergistycznie jako kofaktory APC [22].

Utworzenie kompleksu trombiny z trombomoduliną nie pozostaje bez wpływu na prokoagulacyjną aktywność trombiny, tj. na tworzenie fibryny, aktywację czynnika V i aktywację płytek krwi. Według obserwacji, trombomodulina oddziałując z trombiną hamuje proces polimeryzacji fibryny i aktywacji czynnika V. Ponadto, jak wykazały pomiary agregacji płytek oraz pomiary uwalniania serotoniny z ziarnistości wewnątrzpłytkowych przez trombinę znakowaną J^{125} lub diizopropylofosfotrombinę, powstanie kompleksu trombina-trombomodulina ogranicza i/lub odwraca aktywację płytek krwi [7, 23, 24].

Sądzi się, że obniżona ekspresja trombomoduliny, a więc jej niższe stężenie w osoczu, może przyczynić się do osłabienia aktywacji układu antykoagulacyjnego przez trombinę, oraz do wzrostu stężenia wolnej trombiny w osoczu. Przesuwa to równowagę hemostatyczną 'na korzyść' szlaku prokoagulacyjnego i może sprzyjać tworzeniu zakrzepu w miejscach ewentualnego uszkodzenia naczynia czy na powierzchni rozerwanej blaszki miażdżycowej. Trombomodulina umożliwia zatem funkcjonowanie istotnego z punktu widzenia równowagi hemostatycznej mechanizmu zwanego 'paradoksem trombiny'. Przy niskich stężeniach trombiny jej immobilizacja na powierzchni komórek śródbłonka przy udziale cząsteczki trombomoduliny sprzyja aktywacji białka C i całego układu antykoagulacyjnego. Wzrost stężenia trombiny sprawia, że działa ona przede wszystkim prokoagulacyjnie, prowadząc do polimeryzacji fibrynogenu [2].

Lokalnie i w ograniczonym stopniu TM może przeciwdziałać zależnej od trombiny aktywacji komórek poprzez oddziaływanie z receptorem trombiny. W wyniku niedoboru trombomoduliny może dochodzić do wzmożonej aktywacji komórek śród-

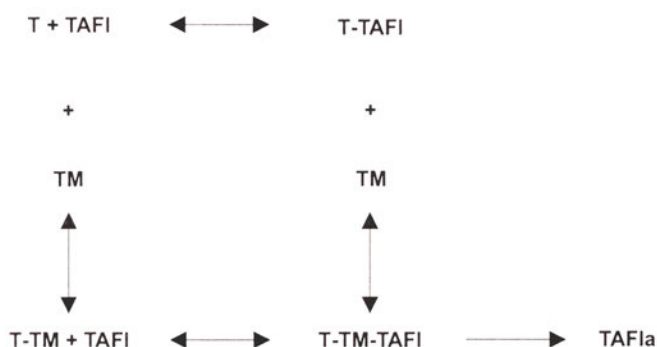
błonka, a następnie do wzrostu ekspresji białek adhezywnych i cząsteczek uczestniczących w procesie zapalnym, zwiększając w ten sposób ryzyko pęknięcia blaszki miażdżycowej i/lub przyczyniając się do progresji miażdżycy [25].

Należy podkreślić, że zależna od trombomoduliny regulacja procesów aktywowania szlaku białka C oraz neutralizacji trombiny, ma również miejsce podczas oddziaływania trombomoduliny odpowiednio z prekursorami trombiny, tzn. meizotrombiną i meizotrombiną (desF1), lub z inhibitorami proteaz, takimi jak antytrombina III (ATIII), kofaktor II heparyny (HCII), inhibitor białka C (PCI). Rola trombomoduliny w neutralizacji trombiny różni się w zależności od rodzaju inhibitora. Jest ona dominująca w przypadku PCI, gdzie warunkiem hamowania aktywności trombiny są oddziaływania typu białko-białko. Przeciwnie, w przypadku aktywacji ATIII i HCII główną rolę odgrywa cząsteczka siarczanu chondroityny, zaś oddziaływanie z trombomoduliną jest jedynie mechanizmem wspomagającym [26-28].

III-3. Udział trombomoduliny w regulacji fibryno- lizy

W doniesieniach z kilku ostatnich lat sugeruje się udział trombomoduliny, jak również niektórych jej rozpuszczalnych fragmentów (produktów ograniczonej proteolizy cząsteczki TM) w regulacji procesów fibryno-
lizy [29, 30]. Wskazują na to doświadczenia z zastosowaniem prokarboksypeptydazy B (pro-pCPB) — jednołańcuchowego białka osoczo-
wego, zwanego także TAFI (ang. *Thrombin Activatable Fibrinolysis Inhibitor*). Procesy molekularne aktywacji TAFI i aktywacji białka C są podobne: aktywacja zymogenów zachodzi na skutek ograniczonej proteolizy w obecności kompleksu trombina/meizotrombina-trombomodulina. W kompleksie tym trombina lub meizotrombina tworzą początkowo dwu-
(zarówno z TAFI jak i trombomoduliną), a następnie trójskładnikowe kompleksy TAFI-trombina-trombomodulina, których powstawanie jest warunkiem proteolizy TAFI do aktywnej formy TAFIa (Ryc. 2). Podobnie jak w przypadku białka C, aktywacja TAFI może zachodzić także w obecności rozpuszczalnych fragmentów trombomoduliny, obejmujących reszty: 1-462, czy 227-462 (fragment TME zawierający sześć domen EGF). Liczba 'elementów' struktury pierwszorzędowej trombomoduliny konieczna do aktywacji TAFI przewyższa jednak liczbę fragmentów cząsteczki wymaganych do aktywacji białka C (różnica dotyczy bliżej nieokreślonych reszt regionu obejmującego domeny 1-3) [30]. Karboksypeptyda-

za B (TAFIa), specyficzna dla grup karboksylowych reszt argininy i lizyny, wykazuje zdolność aktywacji protrombiny w obrębie skrzepu oraz właściwości silnego inhibitora fibrynolizy, ponieważ hamuje wiązanie plazminogenu z fibryną. Okazuje się, że zastosowanie przeciwciał monoklonalnych anti-TAFI znosi efekt hamowania fibrynolizy przez TAFIa. W warunkach



Ryc. 2. Schemat aktywacji inhibitora fibrynolizy aktywowanego przez trombinę (TAFI). Trombina (lub meizotrombina) tworzą dwuskładnikowe kompleksy zarówno z TAFI, jak i trombomoduliną (TM). Oddziaływanie tych dwóch rodzajów heterodimerów ze sobą prowadzi do utworzenia kompleksów trójskładnikowych (T-TM-TAFI) i wiąże się z syntezą aktywnej postaci TAFI (TAFIa) [30].

kach takich, zaznacza się szczególnie profibrynolityczne działanie aktywowanego białka C w osoczu, polegające na jego zdolności do hamowania aktywacji protrombiny oraz hamowania syntezy TAFIa. Obserwacje te wskazują jednocześnie na biologiczne znaczenie zależnej od trombiny aktywacji czynnika TAFI (pro-pCPB), który określany jest często jako ogniwo łączące krzepnięcie i fibrynolizę [31, 32].

IV. Polimorfizmy genetyczne oraz regulacja ekspresji genu trombomoduliny

Gen trombomoduliny zlokalizowany jest na chromosomie 20. Zmienność w obrębie tego genu była jak dotąd przedmiotem jedynie pojedynczych badań obejmujących niewielkie populacje. Dlatego też nie wiadomo z całą pewnością jakie znaczenie należy przypisać obserwowanym polimorfizmom genetycznym, czy ich występowanie mogłoby mieć związek ze zmianami funkcji cząsteczki trombomoduliny, a tym samym — czy występowanie niektórych form polimorfizmów mogłoby wywierać jakkolwiek wpływ na zakłócenie równowagi między procesami krzepnięcia, antykoagulacji i fibrynolizy, a tym samym prowadzić do zmian częstości występowania choroby zakrzepowo-zatorowej.

Największe zainteresowanie badaczy wzbudza dymorfizm nukleotydowy C¹⁴¹⁸/T. Substytucja

C¹⁴¹⁸→T odpowiada za zmianę ⁴⁵⁵Val→Ala w regionie szóstego powtórzenia domeny EGF łańcucha polipeptydowego trombomoduliny. Jest to region istotny w procesie wiązania trombiny i aktywowania białka C, toteż nie powinno dziwić, że polimorfizm ten jest postrzegany jako jeden z potencjalnych czynników prokoagulacyjnych, tzn. przyczyniających się do zwiększania ryzyka choroby zakrzepowej [33-35]. Przypuszcza się, że polimorfizm ten mógłby wpływać na strukturę pierwszorzędową TM, a w konsekwencji na funkcję białka. Nie wyklucza się także, że taka zmiana strukturalna może kształtować zmiany podatności cząsteczki trombomoduliny na działanie enzymów proteolitycznych, a tym wpływać na stężenie TM w osoczu krwi [34]. Analiza częstości alleli C i T w pozycji 1418, przeprowadzona w nielicznych populacjach zdrowych ochotników oraz u osobników charakteryzujących się niedoborem białka C lub trombofilią (skłonnością do rozwoju choroby zakrzepowo-zatorowej) o niewyjaśnionej etiopatogenezie, nie wykazała różnic w częstościach allelu C w pozycji 1418. Z jednej strony, obserwacje takie podważałyby istotne znaczenie dymorfizmu C¹⁴¹⁸/T w etiopatogenezie żylnych chorób zakrzepowo-zatorowych. Z drugiej strony jednak, należy zauważyć, że badane populacje były mało liczne, toteż trudno wyniki te postrzegać jako zależności o charakterze epidemiologicznym [35]. Wyniki badań przeprowadzonych w liczniejszych populacjach, obejmujących osoby zdrowe oraz z przebyłym zawałem mięśnia sercowego nie są spójne: jedynie w niektórych grupach pacjentów z zawałem stwierdzono częstsze występowanie allelu C [33, 34]. Przeświadczenie o potencjalnym znaczeniu dymorfizmu ¹⁴¹⁸C/T jako czynnika ryzyka zawału mięśnia sercowego opiera się obecnie także na obserwacjach wskazujących na większą częstość wariantu cząsteczki TM z Ala⁴⁵⁵ w populacjach osób zdrowych [34]. Pomiary wartości stężenia TM w osoczu osób reprezentujących poszczególne warianty genotypowe (C/C: 3.28 ± 0.63 ng/ml, C/T: 3.29 ± 0.73 ng/ml i T/T: 3.44 ± 1.21 ng/ml) wydają się zaprzeczać istnieniu prostego związku między polimorfizmem ¹⁴¹⁸C/T a stężeniem trombomoduliny. Dlatego też, na podstawie uzyskanych dotąd wyników analiz trudno w sposób jednoznaczny rozstrzygnąć o wpływie dymorfizmu na funkcje cząsteczki TM, takie jak na przykład różnice w aktywności formy tkankowej i osoczowej TM jako kofaktora.

Mutacja punktowa typu substytucji ¹²⁷G→A (opisana po raz pierwszy u 42-letniej kobiety z zakrzepicą w zatoce strzałkowej) prowadzi do zamiany aminokwasu ²⁵Ala→Thr w końcu aminowym

zewnątrzkomórkowej domeny typu lektynowego dojrzałego białka [36]. Przyпуска się, że domena ta mogłaby pełnić rolę w regulacji ekspresji TM na powierzchni komórek śródbłonna [37]. Nie można także wykluczyć, że taka punktowa mutacja, mogłaby powodować zmiany konformacyjne w strukturze domeny typu lektynowego cząsteczki TM, co z kolei mogłoby prowadzić do zmian w funkcjonowaniu pozostałych domen cząsteczki.

Inną różnicę w pierwszorzędowej budowie TM, dotyczącą zamiany ⁴⁶⁸Asp→Tyr wynikającej z substytucji ¹⁴⁵⁶G→T, zaobserwowano u 45-letniego mężczyzny z zatorem tętnicy płucnej [38]. U pacjenta tego (reprezentującego genotyp heterozygotyczny ¹⁴⁵⁶G/T) stwierdzono istotnie obniżone stężenie TM w osoczu w stosunku do średniej wartości stężenia osoczowej TM w populacji osobników zdrowych. Ponieważ w żadnych innych badaniach populacyjnych nie wykryto występowania substytucji ¹⁴⁵⁶G→T, ani w grupach pacjentów z zakrzepicą żylną ani u osobników zdrowych, można przypuszczać, że występuje ona bardzo rzadko i nie ma istotnego znaczenia epidemiologicznego w przypadkach dziedzicznej trombofilii [39]. Z uwagi na tak rzadkie występowanie, trudno w tej chwili ocenić w jakim stopniu zamiana ¹⁴⁵⁶G→T mogłaby mieć znaczenie w kształtowaniu niedoborów TM w osoczu oraz podwyższonej skłonności do epizodów zakrzepowych [39].

Niespełna 10 innych mutacji, rozproszonych w obrębie sekwencji kodujących genu TM wykryto u osób zdrowych lub chorych z zakrzepicą żylną lub zawałem serca (wszystkie opisane przypadki były heterozygotami) [8]. Przyпуска się, że przynajmniej niektóre z tych mutacji mogą mieć istotne znaczenie w kształtowaniu zwiększonej skłonności ich nosicieli do rozwoju chorób zakrzepowych (trombofilii) [8]. Trudno w chwili obecnej ocenić ich znaczenie dla zmian funkcjonalnych w cząsteczce TM, jak również ich wagę jako czynników ryzyka w rozwoju choroby zakrzepowo-zatorowej.

Występowanie pojedynczych modyfikacji w sekwencji nukleotydowej DNA opisywano także dla regionu promotorowego genu TM w populacjach osób zdrowych oraz pacjentów z zawałem mięśnia sercowego. W badaniach tych wykazano pięciokrotnie większą częstość występowania takich modyfikacji wśród osób z zawałem (5/104 przypadki w porównaniu do 1/104 w grupie kontrolnej) [33]. Role takich modyfikacji w regionie promotorowym trudno na razie ocenić z uwagi na brak danych doświadczalnych dotyczących wydajności transkrypcji oraz stężenia TM w osoczu i tkankach u osób reprezen-

tujących określone warianty genotypowe regionu promotorowego genu TM [25].

V. Uwagi końcowe

Trombomodulina występuje w organizmie w dwóch formach: tkankowej oraz osoczowej. Formę osoczową, która zachowuje wymaganą aktywność jako kofaktor w reakcji aktywowania białka C, uważa się za pochodną natywnej formy „tkankowej” [40, 41]. Wydaje się, że w warunkach nadkrzepliwości i/lub przyspieszonej fibrynolizy osoczowa trombomodulina pełni funkcję osłonową względem śródbłonna naczyniowego, przeciwdziałając nadmiernej generacji plazminy, enzymu o małej wybiórczości działania względem licznych białek w komórkach śródbłonna [42]. Stężenie rozpuszczalnych fragmentów trombomoduliny w osoczu wynosi ok. 5-20 ng/ml. Fragmenty te różnią się masą cząsteczkową oraz pozbawione są zwykle domeny błonowej i cytoplazmatycznej. Podwyższone wartości stężenia TM w osoczu, przekraczające nawet 50 ng/ml, mogą świadczyć o uszkodzeniu śródbłonna [29, 43]. Podwyższone stężenia trombomoduliny odnotowuje się w takich stanach chorobowych jak zespół wykrzepiania śródnaczyniowego (DIC), cukrzyca, toczeń rumieniowaty układowy, zatorowość płucna, zespół zaburzeń oddechowych typu dorosłych (ARDS), przewlekła niewydolność nerek, ostra niewydolność wątroby, zakrzepica naczyń mózgowych, miażdżycy, choroba niedokrwienna serca, jak również w przypadkach oporności na aktywowane białko C (APCR) czy hiperhomocysteinemii [44-52]. Ponadto, stężenie TM wzrasta znacząco w ciągu 24-48 godzin (wraz ze wzrostem stresu oksydacyjnego) w osoczu osób leczonych preparatami trombolitycznymi [53]. W przeciwieństwie do tego, obniżone stężenie TM w osoczu zaobserwowano u pacjentów po podaniu niefrakcjonowanej heparyny [54]. Zaobserwowano, że stężenie trombomoduliny w osoczu jest średnio niższe u kobiet oraz że wzrasta ono z wiekiem osoby badanej [55].

Problem użyteczności egzogennej trombomoduliny w terapii chorób zakrzepowo-zatorowych skłonił badaczy licznych ośrodków do podjęcia badań nad tą glikoproteiną jako potencjalnym, silnym czynnikiem przeciwzakrzepowym stosowanym w prewencji i leczeniu powikłań naczyniowych. Uważa się, że podawanie egzogennej trombomoduliny mogłoby prowadzić do obniżenia ryzyka krwawień w porównaniu z terapią heparyną, czy warfaryną. Jakkolwiek dokładny molekularny mechanizm przeciwzakrzepowego działania trombomoduliny nie został jeszcze

poznany, wydaje się, że wstępne wyniki badań wykonywanych na zwierzętach są obiecujące [41, 56]. W badaniach tych porównywano rekombinantowe fragmenty trombomoduliny zawierające zewnątrzkomórkowe domeny ludzkiej trombomoduliny [57-61] oraz rekombinantową ludzką rozpuszczalną trombomodulinę (rhsTM), zawierającą wszystkie zewnątrzkomórkowe domeny trombomoduliny i przypominającą swą aktywnością cząsteczkę natywnej trombomoduliny. Porównanie aktywności niewielkiego rekombinantowego fragmentu cząsteczki trombomoduliny (E456) z rhsTM w badaniach z zastosowaniem krążenia pozaustrojowego u małąp wykazało, że aktywności E456 i rhsTM, jako kofaktorów w procesie aktywacji białka C, były bardzo zbliżone. Różnice właściwości badanych TM dotyczą okresu półtrwania (6.0-9.0 min. dla E456 i 5 godz. dla rhsTM) [57]. Wyniki badań, w których wykazano skuteczność rhsTM w zapobieganiu chorobie zakrzepowo-zatorowej u myszy i szczurów (wywoływanej trombiną) czy zespołowi wykrzepiania śródnaczyniowego (DIC) (indukowanemu czynnikiem tkankowym (TF) lub endotoksynami) u małąp i szczurów wskazują, że rhsTM stanowi jeden z bardziej obiecujących związków przeciwzakrzepowych [58-62].

Podziękowania

Praca finansowana w ramach projektu naukowo-badawczego KBN 4P05B 056 14.

Artykuł otrzymano 18 marca 1999 r.

Zaakceptowano do druku 23 sierpnia 1999 r.

Piśmiennictwo

- Davie EW (1995) *Thromb Haemost* **74**: 1-6
- Griffin JH (1995) *Nature* **378**: 337-338
- Esmon CT, Fukudome K (1995) *Semin Cell Biol* **6**: 259-268
- Esmon CT (1992) *Arterioscler Thromb* **12**: 135-145
- Walker FJ, Fay PJ (1992) *FASEB J* **6**: 2561-2567
- Esmon CT, Owen WG (1981) *Proc Natl Acad Sci USA* **78**: 2249-2252
- Esmon CT (1989) *J Biol Chem* **264**: 4743-4746
- Ohlin AK, Norlund L, Marlar RA (1997) *Thromb Haemost* **78**: 396-400
- Bombeli T, Mueller M, Haerberli A (1997) *Thromb Haemost* **77**: 408-423
- Hirokawa K, Aoki N (1991) *Biochem J* **276**: 739-743
- Horie S, Kizaki K, Ishii H, Kazama M (1992) *Biochem J* **281**: 149-154
- Kapiotis S, Besemer J, Bevec D, Valent P, Bettelheim P, Lechner K, Speiser W (1991) *Blood* **78**: 410-415
- Conway EM, Liu L, Nowakowski B, Steiner Mosonyi M, Jackman RW (1994) *J Biol Chem* **269**: 22804-22810
- Takada Y, Shinkai F, Kondo S, Yamamoto S, Tsuboi H, Korenaga R, Ando J (1994) *Biochem Biophys Res Commun* **205**: 1345-1352
- Zhou Q, Chu X, Ruan C (1994) *Thromb Haemost* **71**: 507-510
- Hayashi T, Honda G, Suzuki K (1992) *Blood* **79**: 2930-2936
- Bartha K, Brisson C, Archipoff G, de la Salle C, Lanza F, Cazenave JP, Beretz A (1993) *J Biol Chem* **268**: 421-429
- Sadler JE (1997) *Thromb Haemost* **78**: 392-395
- Sadler JE, Lentz SR, Sheehan JP, Tsiang M, Wu Q (1993) *Haemostasis* **23 Suppl 1**: 183-193
- Esmon CT (1995) *FASEB J* **9**: 946-955
- Esmon CT (1993) *Thromb Haemost* **70**: 29-35
- Shen L, Dahlback B (1994) *J Biol Chem* **269**: 18735-18738
- Esmon CT, Esmon NL, Harris KW (1982) *J Biol Chem* **257**: 7944-7947
- Esmon NL, Carroll RC, Esmon CT (1983) *J Biol Chem* **258**: 12238-12242
- Esmon CT (1997) *Circulation* **96**: 9-11
- Doyle MF, Mann KG (1990) *J Biol Chem* **265**: 10693-10701
- Rezaie AR, Cooper ST, Church FC, Esmon CT (1995) *J Biol Chem* **270**: 25336-25339
- Koyama T, Parkinson JF, Sie P, Bang NU, Muller Berghaus G, Preissner KT (1991) *Eur J Biochem* **198**: 563-570
- Hosaka Y, Takahashi Y, Ishii H (1998) *Thromb Haemost* **79**: 371-377
- Nesheim M, Wang W, Boffa M, Nagashima M, Morser J, Bajzar L (1997) *Thromb Haemost* **78**: 386-391
- Bajzar L, Morser J, Nesheim M (1996) *J Biol Chem* **271**: 16603-16608
- Bajzar L, Nesheim ME, Tracy PB (1996) *Blood* **88**: 2093-2100
- Ireland H, Kunz G, Kyriakoulis K, Stubbs PJ, Lane DA (1997) *Circulation* **96**: 15-18
- Norlund L, Holm J, Zoller B, Ohlin AK (1997) *Thromb Haemost* **77**: 248-251
- van der Velden PA, Krommenhoek Van Es T, Allaart CF, Bertina RM, Reitsma PH (1991) *Thromb Haemost* **65**: 511-513
- Norlund L, Zoller B, Ohlin AK (1997) *Thromb Haemost* **78**: 1164-1166
- Conway EM, Pollefeyst S, Collen D, Steiner Mosonyi M (1997) *Blood* **89**: 652-661
- Ohlin AK, Marlar RA (1995) *Blood* **85**: 330-336
- Faioni EM, Merati G, Peyvandi F, Bettini PM, Mannucci PM (1997) *Blood* **89**: 1467
- Ishii H, Majerus PW (1985) *J Clin Invest* **76**: 2178
- Takahashi Y, Hosaka Y, Niina H, Nagasawa K, Naotsuka M, Sakai K, Uemura A (1995) *Thromb Haemost* **73**: 805-811
- Okajima K, Abe H, Binder BR (1995) *J Lab Clin Med* **126**: 377-384
- Takahashi Y, Ito H, Hanano M, Wada K, Niwano H, Seki Y, Shibata A (1992) *Am J Haematol* **41**: 32-39
- Takano S, Kimura S, Ohdama S, Aoki N (1990) *Blood* **76**: 2024-2029
- Kawakami M, Kitani A, Hara M, Harigai M, Suzuki K, Kawaguchi Y, Ishii H, Kazama M, Kawagoe M, Nakamura H (1992) *J Rheumatol* **19**: 1704-1709
- Seki Y, Takahashi H, Shibata A, Aizawa Y (1997) *Blood Coagul Fibrinolysis* **8**: 391-396
- Sumida Y, Wada H, Fujii M, Mori Y, Nakasaki T, Shimura M, Hiyoyama K, Yano Y, Deguchi K, Shiku H, et al. (1997) *Blood Coagul Fibrinolysis* **8**: 303-307
- Reverter JL, Reverter JC, Tassies D, Rius F, Monteagudo J, Rubies Prat J, Escobar G, Ordinas A, Sanmarti A (1997) *Am J Hematol* **56**: 93-99
- Blann AD, Seigneur M, Steiner M, Boisseau MR, McCollum CN (1997) *Eur J Clin Invest* **27**: 916-921

50. Blann AD, Amiral J, McCollum CN (1996) *Br J Haematol* **95**: 263-265
51. Nowak Gottl U, Vielhaber H (1997) *Eur J Haematol* **58**: 51-55
52. Van den Berg M, Boers GH, Franken DG, Blom HJ, Van Kamp GJ, Jakobs C, Rauwerda JA, Kluft C, Stehouwert CD (1995) *Eur J Clin Invest* **25**: 176-181
53. Ohlin AK, Morser J, Ohlin H (1996) *Thromb Res* **82**: 313-322
54. Cella G, Rampin E, Sbarai A, Meneghin C, Toffoli S, Girolami A (1997) *Blood Coagul Fibrinolysis* **8**: 365-366
55. Loreth RM, Berger HH, Albert VW (1997) *Thromb Haemost Suppl* 550
56. Takahashi Y, Hosaka Y, Imada K, Adachi T, Niina H, Watanabe M, Mochizuki H (1997) *Thromb Haemost* **77**: 789-795
57. Suzuki M, Mohri M, Yamamoto S (1998) *Thromb Haemost* **79**: 417-422
58. Gomi K, Zushi M, Honda G, Kawahara S, Matsuzaki O, Kanabayashi T, Yamamoto S, Maruyama I, Suzuki K (1990) *Blood* **75**: 1396-1399
59. Mohri M, Oka M, Aoki Y, Gonda Y, Hirata S, Gomi K, Kiyota T, Sugihara T, Yamamoto S, Ishida T, et al. (1994) *Am J Hematol* **45**: 298-303
60. Gonda Y, Hirata S, Saitoh K, Aoki Y, Mohri M, Gomi K, Sugihara T, Kiyota T, Yamamoto S, Ishida T, et al. (1993) *Thromb Res* **71**: 325-335
61. Aoki Y, Takei R, Mohri M, Gonda Y, Gomi K, Sugihara T, Kiyota T, Yamamoto S, Ishida T, Maruyama I (1994) *Am J Hematol* **47**: 162-166
62. Mohri M, Gonda Y, Oka M, Aoki Y, Gomi K, Kiyota T, Sugihara T, Yamamoto S, Ishida T, Maruyama I (1997) *Blood Coagul Fibrinolysis* **8**: 274-283

Plazmidy eukariotyczne

The eukariotic plasmids

KRZYSZTOF LEŚNIEWICZ*

Spis treści

- I. Wstęp
- II. Lokalizacja subkomórkowa i występowanie
- III. Struktura
 - III.1. Liniowe plazmidy DNA
 - III.2. Koliste plazmidy DNA
 - III.3. Plazmidy RNA
- IV. Ewolucja plazmidów eukariotycznych
- V. Podsumowanie

Wykaz skrótów: pz (tpz) — liczba par zasad (tysiące); Da (kDa) — Daltony (tysiące); ORF — otwarta ramka odczytu; TIR — ang. *terminal inverted repeat*.

I. Wstęp

Plazmidy eukariotyczne nigdy nie cieszyły się zainteresowaniem równym temu, jakie towarzyszyło plazmidom prokariotycznym. Wieloletnie badania doprowadziły do zgromadzenia licznych danych dotyczących głównie ich budowy i występowania, lecz nie dały odpowiedzi na szereg pytań, z których najważniejsze dotyczy relacji jakie wiążą je z organizmami zasiedlanych gospodarzy. Niepowodzeniem skończyły się również próby wykorzystania plazmidów eukariotycznych do konstrukcji wektorów genetycznych. Tym niemniej, stanowią one interesujący materiał ze względu na związek z wieloma zagadnieniami, takimi jak: ewolucja organelli, wirusów, elementów mobilnych i intronów. Ponadto, poznanie horyzontalnego transferu plazmidów eukariotycznych może pomóc w wyjaśnieniu znaczenia symbiogenyzy w procesie ewolucji molekularnej.

Plazmidy eukariotyczne stanowią podgrupę pozachromosomalnych elementów genetycznych, do których na ogół zaliczane są również jądrowe cząsteczki DNA wyodrębniające się bezpośrednio z chromoso-

Contents

- I. Introduction
- II. Subcellular localization and distribution.
- III. Structure
 - III.1. Linear DNA plasmids
 - III.2. Circular DNA plasmids
 - III.3. RNA plasmids
- IV. Evolution of eukaryotic plasmids
- V. Summary

mów, genomy organellowe oraz wirusy zasiedlające organizmy eukariotyczne. Pomimo, że plazmidy wykazują wiele cech wspólnych z innymi pozachromosomalnymi elementami genetycznymi, to istnieje szereg przyczyn dla których są one traktowane jako odrębna grupa cząsteczek.

Obecnie, termin plazmidy eukariotyczne stosuje się najczęściej do tych cząsteczek DNA lub RNA, które jako niezależne replikony, zdolne są do trwałego utrzymywania się w komórce poza strukturami chromosomów jądrowych i organellowych (mitochondria i chloroplasty). Do plazmidów eukariotyczne nie zalicza się jednak tych cząsteczek DNA, które po oddzieleniu się od chromosomów mogą egzystować w komórce jako niezależne replikony, lub niestabilne formy przejściowe [1, 2]. W przeciwieństwie do nich, plazmidy eukariotyczne na ogół nie posiadają homologii do sekwencji obecnych w chromosomach lub homologia ta jest stosunkowo ograniczona. Od wirusów plazmidy eukariotyczne odróżniają się natomiast tym, że nie występują w środowisku pozakomórkowym, a także, z nielicznymi wyjątkami, nie obserwuje się typowej dla wirusów budowy, czyli cząsteczek DNA lub RNA opłaszczonych kapsydem białkowym. Ponadto plazmidy są stałym elementem genetycznym charakterystycznym dla przedstawicieli danej jednostki systematycznej, co wynika z faktu, że cząsteczki te mogą być dziedziczone zarówno płciowo jak i somatycznie.

Termin — plazmid eukariotyczny — został przyjęty ze względu na analogię do plazmidów prokariotycznych, z którymi łączy je zdolność do trwałego

*Dr., Zakład Biologii Molekularnej Roślin, Instytut Biologii Molekularnej i Biotechnologii, Uniwersytet im. A. Mickiewicza, ul. Międzychodzka 5, 60-371 Poznań.

utrzymywania się w komórce i replikowania w stanie autonomicznym [3]. Jednak ze względu na brak danych dotyczących funkcji większości plazmidów eukariotycznych oraz na ich podobieństwo do innych elementów genetycznych, niektórzy autorzy stosują także terminy: cząsteczki plazmidopodobne, wirusopodobne, episomalne lub minikoliste.

Na podobne trudności napotyka także próba przedstawienia jednoznacznej klasyfikacji plazmidów. Podobnie jak w przypadku wirusów, pochodzenie filogenetyczne poszczególnych plazmidów eukariotycznych nie jest znane, a w związku z tym nie może stanowić podstawy do ich klasyfikacji. Na ogół opiera się ona na podstawie: budowy (koliste, liniowe, DNA, RNA), grupy taksonomicznej do której należy gatunek będący ich gospodarzem (zwierzęta, grzyby lub rośliny), lub lokalizacji subkomórkowej (jądrowe, mitochondrialne, chloroplastowe lub cytoplazmatyczne).

II. Lokalizacja subkomórkowa i występowanie

Lokalizacja subkomórkowa plazmidów eukariotycznych wskazuje na wyraźną preferencję do zasiedlania mitochondriów. Interesujące jest to, że tylko w kilku przypadkach zlokalizowano plazmidy na terenie jądra komórkowego [4] i chloroplastów [5]. Preferencja plazmidów do zasiedlania mitochondriów ma najprawdopodobniej związek ze zróżnicowanym rozpowszechnieniem tego typu form wśród przedstawicieli poszczególnych podkrólestw. Analiza właściwości genomów mitochondrialnych grzybów, roślin i zwierząt wskazuje bowiem na szereg istotnych różnic, które mają swoje odzwierciedlenie w zdolności do utrzymywania plazmidów.

Genom mitochondrialny zwierząt, na który składają się cząsteczki o wielkości od 14 do 39 tys. par zasad, w przeciwieństwie do genomów mitochondrialnych przedstawicieli pozostałych eukariotów, wykazuje dużą stabilność oraz „oszczędność” przejawiającą się brakiem intronów oraz dłuższych, niekodujących sekwencji międzygenowych [6]. Jakkolwiek nie znana jest przyczyna takiej struktury genomu mitochondrialnego zwierząt, to cecha ta dobrze koreluje z brakiem plazmidów na terenie tych organelli. Obecność cząsteczek, które mogą być uznane za plazmidy mitochondrialne, zaobserwowano tylko u przedstawicieli *Trypanosoma* i *Paramecium*. W przypadku *Trypanosoma*, na genom mitochondrialny, oprócz dużych cząsteczek kolistych (ang. *maxicircle* DNA), składają się liczne ko-

pie cząsteczek minikolistych (ang. *minicircle* DNA) które tworzące typową dla tego rodzaju strukturę kinetoplastu [7]. Cząsteczki te nie są jednak na ogół klasyfikowane jako plazmidy. Za plazmidy uznaje się natomiast pozachromosomalne cząsteczki DNA występujące w mitochondriach *Paramecium* [8]. Należy jednak pamiętać, że zarówno w przypadku *Trypanosoma* jak i *Paramecium*, obecność plazmidów koreluje z nietypową dla zwierząt strukturą zasadniczego genomu mitochondrialnego.

Odmienne cechy, z stosunku do mitochondriów zwierząt, posiadają natomiast genomy mitochondrialne roślin i grzybów. Charakteryzują się one obecnością znacznych ilości dodatkowych sekwencji, nie zwiększających istotnie potencjału kodującego tych organelli oraz zróżnicowaną budową fizyczną chromosomów mitochondrialnych [9]. W omawianym kontekście zwrócić należy uwagę na budowę fizyczną genomu mitochondrialnego roślin, gdyż w przeciwieństwie do zwierząt, stanowi ją zróżnicowana pula cząsteczek DNA powstających w wyniku homologicznej rekombinacji sekwencji powtórzonych istniejących w obrębie cząsteczki określanej jako „*master chromosom*”. Bogactwo form powstałych w wyniku jego rearanżacji jest tak duże, że na tym tle trudno jest mówić o mitochondrialnych formach pozachromosomalnych, w rozumieniu analogicznym do pozachromosomalnych form genetycznych obecnych w jądrze komórkowym. Tym niemniej, plazmidy zasiedlające mitochondria roślin stanowią wyraźnie odrębną klasę cząsteczek, łatwą do odróżnienia od DNA zasadniczego genomu mitochondrialnego.

Obecnie, zdecydowana większość informacji na temat plazmidów mitochondrialnych pochodzi z badań prowadzonych na grzybach, u które występują one najczęściej. Dotyczy to przede wszystkim dobrze scharakteryzowanych genetycznie gatunków z rodzajów: *Saccharomyces*, *Neurospora*, *Claviceps* i *Podospora*. W obrębie tylko jednego rodzaju — *Neurospora* — zidentyfikowano wiele typów plazmidów a pojedyncze szczepy mogą zawierać przedstawicieli nawet 11 z nich [10].

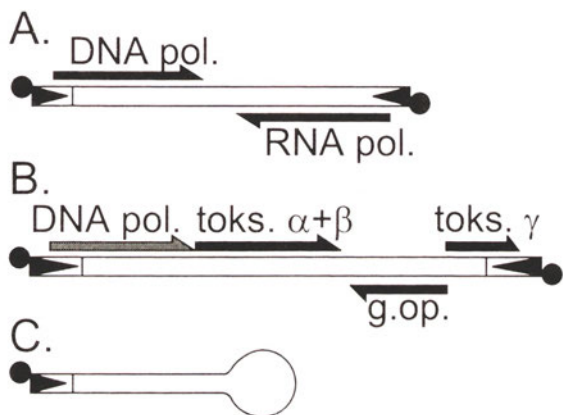
W przypadku jądra komórkowego, większość zbadanych pozachromosomalnych elementów genetycznych są to cząsteczki powstające poprzez wyodrębnianie się fragmentów DNA z chromosomów. Tylko w kilku przypadkach w organellach tych odkryto cząsteczki typowo plazmidowe. Najlepiej poznane z nich to plazmidy 2 μ m występujące u drożdży [11] oraz liczne plazmidy występujące u gatunków rodzaju *Diktyostelium* [12, 4]. W obu tych przy-

padkach budzą one zainteresowanie z przyczyn praktycznych, gdyż mogą one stanowić cenny materiał do konstrukcji wektorów genetycznych.

III. Struktura

III-1. Liniowe plazmidy DNA

Pomimo dużego zróżnicowania na poziomie sekwencji nukleotydowej, plazmidy liniowe występujące u przedstawicieli wszystkich podkrólestw wykazują znaczne podobieństwo pod względem organizacji genetycznej (Ryc. 1) [13]. Częsteczki te, o



Ryc. 1. Przykłady eukariotycznych plazmidów liniowych (inwertroń). Czarne strzałki oznaczają pozycję poszczególnych ORF, czarne trójkąty oznaczają sekwencje TIR z cząsteczkami białek terminalnych na 5' końcach obu nici. DNA pol. — polimeraza DNA; RNA pol. — polimeraza RNA; toks. α, β, γ — geny kodujące poszczególne toksyny; g.op. — gen kodujący oporność na toksyny. A — plazmid mitochondrialny *maranhar* (7052pz) z *Neurospora crassa* [28]. B — plazmid cytoplazmatyczny pGKL1 z *Kluyveromyces lactis* [22]. C — modyfikacja plazmidu *kalilo*. Struktura „szpilki do włosów” [26].

wielkości od kilku do kilkunastu tys. par zasad, posiadają na obu końcach sekwencje powtórzone w odwrotnej orientacji (TIR) o długości kilkuset par zasad. Końce 5' obu nici DNA połączone są kowalencyjnie z pojedynczymi cząsteczkami białek terminalnych, które pełnią funkcję starterów w procesie replikacji. Większość plazmidów liniowych koduje białka zaangażowane w procesy własnej replikacji i transkrypcji. Plazmidy te, podobnie jak inne formy genetyczne posiadające tego typu budowę (niektóre bakteriofagi, adenowirusy, elementy mobilne) określone są wspólną nazwą jako inwertroń (od sekwencji — „inverted repeat”) [14, 9].

Podobnie jak inwertroń wirusowe, plazmidy liniowe podlegają replikacji wg modelu „odsuwanej nici” (ang. *strand displacement*). Analiza sekwencji kodujących polimerazy DNA plazmidów liniowych wykazała obecność konserwatywnych motywów charakterystycznych dla TPP polimeraz DNA (ang.

terminal protein primer DNA polimerase) bakteriofagów φ 29, PRD1 [15]. W replikacji prowadzonej przez TPP polimerazy DNA, białko terminalne związane kowalencyjnie z 5' końcem nici DNA pełni funkcję startera, do którego przyłączona zostaje 5' fosforanową grupa pierwszego mononukleotydu syntetyzowanej nici DNA [16]. Charakterystyczną cechą TPP polimeraz DNA plazmidów liniowych jest obecność na N końcach łańcuchów polipeptydowych dodatkowej domeny, nie mającej swojego odpowiednika u polimeraz bakteriofagowych. Ponieważ sekwencja tej domeny zawiera motywy zbliżone do sekwencji poznanych białek terminalnych niektórych bakteriofagów (S-Y-K-N), a w plazmidach nie zidentyfikowano ORF kodującej tego typu białko, przypuszcza się że w tym przypadku może być ono zbudowane z N końcowej domeny TTP polimerazy DNA [17].

Zdecydowana większość plazmidów liniowych tworzy tylko dwa transkrypty, z których jeden koduje polimerazę DNA, drugi natomiast polimerazę RNA. Oba zlokalizowane są na różnych niciach DNA, a ich promotory znajdują się w odpowiednich sekwencjach TIR, co oznacza, że w obu przypadkach transkrypcja następuje w kierunku do środka cząsteczki. Sekwencje promotorowe różnych plazmidów wykazują znaczne podobieństwo do promotorów bakteriofagów T7, SP6 a także niektórych genów mitochondrialnych [9]. Podobieństwo to wynika najprawdopodobniej z faktu, że we wszystkich tych przypadkach w proces transkrypcji zaangażowany jest ten sam rodzaj polimerazy RNA. Polimerazy tego typu, zbudowane z jednej podjednostki (ang. *single subunit RNA polimerase*), kodowane są zarówno przez plazmidy liniowe, jak i niektóre bakteriofagi oraz adenowirusy. Również kodowane jądrowo mitochondrialne polimerazy RNA grzybów, zwierząt i roślin reprezentują ten typ cząsteczek [9, 73].

Pomimo, że na ogół obserwuje się powstawanie dwóch cząsteczek RNA na obu niciach DNA plazmidów liniowych, to znane są również warianty obejmujące inne ilości transkryptów oraz otwartych ramek odczytu. Np. plazmid mF występujący w mitochondriach *Physarium polycephalum*, zawiera 9 sekwencji ORF zlokalizowanych na jednej nici DNA, która ulega transkrypcji prowadzącej do powstania co najmniej 5 różnych cząsteczek RNA [18]. Przypuszcza się, że obecność tak dużej liczby ORF ma związek z indukowanym przez ten plazmid efektem fuzji mitochondriów. Ponadto, niektóre plazmidy liniowe roślin, posiadają dodatkowe sekwencje pochodzące najprawdopodobniej z chloroplastów. W plazmidach kukurydzy, zidentyfikowano fragmenty

genu *psbA*, oraz pełne kopie chloroplastowych genów tRNA^{Pro} i tRNA^{Trp}. Oba geny tRNA zlokalizowane są na plazmidzie 2,3 kb oraz ulegają transkrypcji dostarczając mitochondriom jedyne, syntetyzowanego w tych organellach tRNA^{Trp} [19].

Innym ciekawym przykładem plazmidów, o dodatkowym potencjale kodującym, są niektóre plazmidy cytoplazmatyczne [20]. Posiadają one dodatkowe ORF, warunkujące występowanie fenotypu „zabójcy” (ang. *killer phenotype*) [21]. Fenotyp ten przejawia się wydzielaniem do otoczenia toksyny białkowej, która niszczy komórki innych szczepów grzybów. Zjawisko to (typowe również dla niektórych plazmidów dsRNA) zostało najlepiej scharakteryzowane u szczepów gatunku *Kluyveromyces lactis*. Zawierają one plazmidy pGKL-1, -2 (Ryc. 1B) kodujące białko będące inhibitorem cyklazy adenylowej [22]. Oporność własna na toksyczne właściwości tego białka uwarunkowana jest czynnikami kodowanymi przez ten sam plazmid, lub przez inny element genetyczny gospodarza [23].

Nietypowe plazmidy liniowe zidentyfikowano u *Paramecium*. W mitochondriach przedstawicieli tego rodzaju, oprócz cząsteczek o budowie typowej dla plazmidów liniowych (klasa I i III) występują także plazmidy, których formy monomeryczne posiadają strukturę szpilek do włosów (klasa II). Cząsteczki te zakończone są na jednym końcu pętlą a na drugim fragmentem jednoniciowym. Hybrydyzacja jednoniciowych końców dwóch cząsteczek prowadzi do powstania form dimerycznych [24]. Należy przy tym zwrócić uwagę, że cząsteczki zasadniczego genomu mitochondrialnego *Paramecium*, o wielkości ok. 40 tpb, mają również budowę szpilek do włosów [25].

Analiza plazmidów liniowych wykazała, że oprócz cząsteczek o zasadniczej budowie występują także różne formy pochodne. Powstają one najczęściej w wyniku rekombinacji różnych cząsteczek plazmidowych, bądź w wyniku błędów zachodzących w trakcie ich replikacji. W wyniku tych procesów powstają cząsteczki z delecjami obejmującymi centralną część plazmidu, powtórzeniami obejmującymi na ogół sekwencje TIR [26] lub o budowie szpilek do włosów, analogicznych jak w przypadku *Paramecium* [27] (Ryc. 1C). Ze względu na niekompletne sekwencje genów kodujących polimerazy RNA lub DNA, formy te mogą utrzymywać się tylko w obecności plazmidów niezmodyfikowanych.

Inny charakter posiada modyfikacja prowadząca do powstania cząsteczek plazmidowych, które na obu końcach zawierają długie sekwencje powtórzone zbudowane z sekwencji zasadniczego genomu mi-

tochondrialnego. Budzi ona szczególne zainteresowanie badaczy ze względu na fakt, że często prowadzi do zmian fenotypowych gospodarza. Modyfikacja tego typu występuje u kilku gatunków grzybów oraz roślin i najlepiej została scharakteryzowana u przedstawicieli rodzajów: *Neurospora*, [28], *Podospora* [29] oraz u kukurydzy [30]. Kolonie *Neurospora*, w optymalnych warunkach, mają zdolność nicograniczonego wzrostu, który może ulec zahamowaniu jedynie na skutek działania czynników zewnętrznych. Zaobserwowano jednak, że kolonie szczepów zawierających mitochondrialne plazmidy liniowe *kalilo* i *maranhar* wykazują objawy starzenia i śmierci po serii około 20 pasażi. Efekt ten wywołany jest integracją plazmidu z cząsteczką chromosomu mitochondrialnego, w wyniku której powstała cząsteczka hybrydowa ulega preferencyjnej akumulacji prowadzącej w konsekwencji do zaburzenia metabolizmu mitochondrium i śmierci komórki. Ustalono, że procesie tym bierze udział krótka, około 25 nukleotydowa sekwencja z obszaru TIR wykazująca ograniczoną homologię z miejscem integracji w mt DNA [31]. Natomiast u *Podospora*, w przeciwieństwie do *Neurospora*, proces starzenia stymulowany jest czynnikami jądrowymi i może ulec supresji w wyniku integracji plazmidu liniowego pLA2-1 z genomem mitochondrialnym [29].

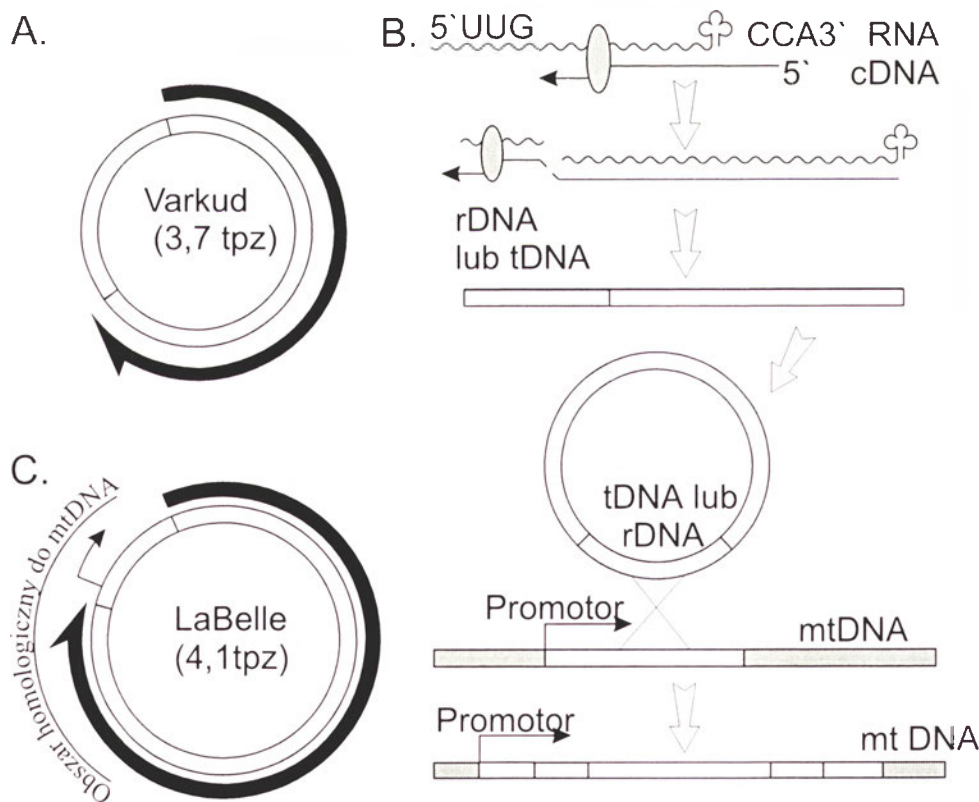
Najlepiej poznany przykład integracji plazmidu liniowego z genomem mitochondrialnym roślin dotyczy plazmidów kukurydzy. Występowanie plazmidów S1 i S2 w postaci wolnej lub zintegrowanej z mtDNA różnych typów cytoplazmy (S, C, T, N) w początkowym okresie badań sugerowało istnienie związku z cechą cytoplazmatycznej męskiej sterility (CMS) [32]. Dalsze badania nie potwierdziły jednak tego typu zależności [33, 34]. U roślin proces rekombinacji może zachodzić zarówno pomiędzy dwoma plazmidami, jak i plazmidem a cząsteczką zasadniczego genomu mitochondrialnego. Ustalono, że plazmid S1 jest formą hybrydową, powstałą przez rekombinację plazmidu R1 i R2 [35], natomiast w przypadku cytoplazmy N, proces rekombinacji doprowadził do trwałej integracji plazmidów R1 i R2 z mtDNA. Proces integracji u kukurydzy, w przeciwieństwie do analogicznego, obserwowanego u grzybów, oparty jest na homologicznej rekombinacji plazmidowego obszaru TIR z fragmentem sekwencji trwale zintegrowanego z mt DNA plazmidu R. Ponadto zaobserwowano występowanie sekwencji homologicznych do plazmidów S1, S2 i 2,3kb w jądrowym DNA kukurydzy, co sugeruje możliwość przenoszenia i rekombinacji plazmidów także z DNA tego przedziału komórkowego [36].

III-2. Kolisty plazmidy DNA

W porównaniu do plazmidów liniowych, plazmidy kolisty wykazują większą różnorodność zarówno pod względem organizacji genetycznej jak i pochodzenia. Na ogół są to cząsteczki o wielkości kilku tys. par zasad, które kodują tylko jeden transkrypt [9]. Podobnie jak w przypadku plazmidów liniowych, większość plazmidów kolistych zidentyfikowano na terenie mitochondriów. Do najlepiej poznanych przykładów plazmidów grzybowych należą Mauriceville, Varkud [37] i LaBelle [38] występujące u *Neurospora* (Ryc. 2A, C). Zainteresowanie plazmidami Mauriceville i Varkud wynika z faktu, że wykazują one właściwości typowe dla retroelementów. W postaci monomerycznej mają one wielkość odpowiednio 3,6 i 3,7 tpz. a ich sekwencje kodują pojedyncze białko o wielkości 81 kDa i aktywności odwrotnej transkryptazy (RT polimerazy). Plazmidy te

strukturą tRNA-podobną, pełniącą funkcję startera w sposób analogiczny jak podczas replikacji niektórych roślinnych wirusów RNA [39].

Mechanizm replikacji oparty na odwrotnej transkrypcji, prowadzić może w niektórych przypadkach do powstania nowej formy genetycznej o charakterze retrotranspozonu. Stwierdzono, że cząsteczka plazmidu Varkud, na etapie syntezy nici cDNA, może integrować z jedną z cząsteczek rRNA lub tRNA obecnych na terenie mitochondrium, co prowadzi do powstania cząsteczki hybrydowej (Ryc. 2B). Cząsteczka ta może następnie integrować z chromosomem mitochondrialnym na drodze homologicznej rekombinacji z odpowiednią sekwencją genów tDNA lub rDNA. Dalszą konsekwencją tego procesu może być powstanie elementu mobilnego, gdyż w przypadku gdy zintegrowany plazmid ulegać będzie transkrypcji pod kontrolą promotora genu tDNA lub rDNA, to powstająca cząsteczka hybrydowego RNA



Ryc. 2. Przykłady eukariotycznych plazmidów kolistych. A. Plazmid Varkud z *Neurospora intermedia* [37]. Strzałka oznacza pozycję ORF kodującej RT polimerazę. B. Schemat powstawania elementu mobilnego na skutek integracji plazmidu Varkud z mtDNA (opis w tekście) [37]. C. Plazmid LaBelle [38]. Strzałka oznacza pozycję ORF kodującą polimerazę DNA.

ulegają transkrypcji, w wyniku której powstają cząsteczki RNA o wielkości odpowiadającej pełnej długości cząsteczek DNA (Ryc. 2A). Transkrypty te pełnią funkcję zarówno mRNA jak i są matrycą dla syntezy cDNA podczas replikacji. Synteza ta rozpoczyna się od związania polimerazy z 3' końcówą

może ponownie ulec odwrotnej transkrypcji, a następnie włączeniu w innym miejscu chromosomu mitochondrialnego [37].

Także plazmid LaBelle (Ryc. 2C), mimo że nie jest retroelementem i nie wykazuje homologii do plazmidów Mauriceville i Varkud, posiada pewne cechy

analogiczne do tej grupy cząsteczek. Podobnie jak one, ulega transkrypcji prowadzącej do powstania cząsteczki RNA, która obejmuje niemal pełną sekwencję plazmidu i która zawiera sekwencję kodującą białko o wielkości 120 kDa. Białko to posiada aktywność polimerazy DNA, jednak w obrębie jego sekwencji aminokwasowej zidentyfikowano VII bloków konserwatywnych typowych dla RT polimerazy. Podobnie jak w przypadku wielu innych plazmidów grzybów, fragmenty sekwencji LaBelle zidentyfikowano także w obrębie chromosomu mitochondrialnego zarówno u *N. crassa* jak i *N. Intermedia*, mimo że plazmid w postaci wolnej zlokalizowano do tej pory tylko w szczepie LaBelle-1b *N. Intermedia* [38].

Poznane do tej pory koliste plazmidy roślin stanowią stosunkowo jednorodną grupę. Cząsteczki te mają na ogół wielkość od 1 do 2 tpz i w przypadkach gdy ulegają transkrypcji, tworzą tylko jeden transkrypt o wielkości kilkuset pz. W większości przypadków transkrypt ten nie zawiera jednak ORF, których długość wskazywałaby, że mogą one kodować białka o aktywności polimeraz. Do chwili obecnej funkcja tych transkryptów nie została poznana.

Analiza porównawcza sekwencji plazmidów kolistych roślin nie wykazała żadnej homologii do zasadniczego genomu mitochondrialnego gospodarzy. Zaobserwowano natomiast występowanie bloków sekwencji homologicznych pomiędzy plazmidami występującymi w obrębie jednego, lub różnych gatunków. Interesujące jest to, że są to najczęściej sekwencje powtórzone w orientacji prostej (ang. *direct repeat*) oraz odwróconej (ang. *inverted repeat*) [40]. Konsekwencją tego typu budowy, jest możliwość występowania struktur „szpilek do włosów”, których obecność ma najprawdopodobniej związek z miejscem *ori* replikonów mitochondrialnych [9]. Sugestie te zostały potwierdzone przez badania przeprowadzone na plazmidach *Vicia faba*, które wykazały, że w trakcie ich replikacji widełki replikacyjne (struktura θ) powstają w pobliżu sekwencji odwróconych [41]. Interesujący jest również fakt, że u kilku badanych plazmidów miejsce to związane było ze strukturami „szpilek do włosów”, analogicznych pod względem długości pnia, jak i wielkości oraz lokalizacji pętli górnej i bocznej, pomimo braku wzajemnej homologii sekwencji. Sugeruje to, że w procesie replikacji cząsteczek tego typu, zasadnicze znaczenie odgrywa nie budowa I rzędowa, lecz struktura II rzędowa nici DNA. Proces replikacji poznano także dla mitochondrialnego plazmidu *mpl* z *Chenopodium album*, który odbywa się wg mechanizmu „toczącego się koła” [42]. Plazmid ten, w przeciwień-

stwie do powyższych przykładów, charakteryzuje się brakiem sekwencji „*inverted repeat*”, oraz obecnością dwóch stosunkowo długich ORF (171 i 246 pz), których funkcja nie została do tej pory poznana.

Podobnie jak w przypadku plazmidów liniowych, także plazmidy koliste mogą tworzyć nowe formy rekombinacyjne. Oprócz plazmidów o budowie monomerycznej, często obserwuje się występowanie kolistych konkatamerów powstających w wyniku homologicznej rekombinacji zachodzącej pomiędzy sekwencjami kilku cząsteczek [43, 44]. Możliwe jest również tworzenie nowych form w wyniku rekombinacji zachodzącej obrębie pojedynczej cząsteczki plazmidu [45].

III.3. Plazmidy RNA

Dwu- i jednoniciowe cząsteczki RNA (ds i ssRNA), o strukturze liniowej oraz kolistej, nie będące transkryptami DNA gospodarza, od dawna były obserwowane u różnych gatunków grzybów i roślin. Większość z nich stanowią genomy wirusów RNA atakujących organizmy eukariotyczne. Część z nich posiada jednak cechy typowe dla plazmidów lub wykazuje cechy wspólne dla obu tych grup, co powoduje, że często są one określane jako cząsteczki wirusopodobne lub plazmidopodobne. Przyjmuje się, że plazmidami RNA są te cząsteczki, które nie są transkryptami genomu gospodarza a ich replikacja odbywa się z pominięciem etapu DNA (jak to ma miejsce w przypadku retroelementów). Ponadto plazmidy RNA nie występują pozakomórkowo w postaci związanej z białkami kapsydowymi. Należy jednak zaznaczyć, że u grzybów zaobserwowano wiele cytoplazmatycznych, wirusopodobnych cząsteczek RNA (ang. *viruslike particles-VLPs*) w postaci opłaszczonej kapsydem białkowym [46]. Kapsydy te nie pełnią jednak funkcji związanych z przenoszeniem cząsteczki dsRNA pomiędzy różnymi organizmami, a jedynie umożliwiają ich trwałą egzystencję w komórce gospodarza [47].

Pomimo intensywnych badań prowadzonych w ostatnich latach, plazmidy RNA są stosunkowo słabo poznaną grupą pozachromosomalnych elementów genetycznych. Ponieważ obszerniejsze dane, szczególnie sekwencyjne, posiadamy jedynie w kilku przypadkach, trudno jest o uogólnienia dotyczące wielu zasadniczych kwestii związanych z tą grupą cząsteczek. Nie wiadomo między innymi, jak szeroki jest zasięg ich występowanie, oraz jaka jest lokalizacja subkomórkowa większości z nich.

W podkrólestwie grzybów, większość plazmidów ssRNA i dsRNA zidentyfikowano u gatunków pato-

gennych, symbiotycznych i u drożdży, u których prezentują one wyjątkowo dużą różnorodność. Zarówno u grzybów jak i u roślin często obserwuje się występowanie danego plazmidu RNA w postaci zarówno jedno jak i dwuniciowej. Na przykład, jednoniciowe koliste plazmidy 20S i 23S posiadają sekwencję w pełni homologiczną do dwuniciowych, kolistych cząsteczek W i T RNA [48]. Natomiast cechą, która odróżnia plazmidy RNA drożdży od plazmidów roślin wyższych, jest występowanie kapsydów białkowych niezbędnych do stabilnego utrzymywania się tych cząsteczek w cytoplazmie grzybów. Stwierdzono, że białka te mogą być syntetyzowane przez różne plazmidy zarówno w układzie *cis* jak i *trans* [46].

Obecność większości plazmidów RNA nie koreluje z żadnymi cechami fenotypowymi. Do wyjątków należą plazmidy M1 i M2, występujące odpowiednio w szczepach K1 i K2 (ang. *killer strains*) *Saccharomyces cerevisiae*. Warunkują one fenotyp umożliwiający niszczenie komórek drożdży innych szczepów [49]. Innym przykładem funkcji plazmidów RNA jest zjawisko hypowirulencji. Polega na osłabieniu wirulencji szczepów patogennych zawierających daną formę dsRNA. Cząsteczki tego typu, o strukturze liniowej i wielkości ok. 12-14 tpz, zaliczane są do rodziny wirusów *Hypoviradae* [50]. Brak białek kapsydowych oraz fakt, że nie występują one pozakomórkowo powoduje, że zaliczane są również do plazmidów. Ustalono, że cząsteczki te posiadają strukturę zbliżoną do potywirusów, gdyż ich ORF (1 lub 2) zlokalizowane są zawsze na jednej nici RNA i odpowiedzialne są za syntezę jednej cząsteczki białka, która następnie ulega fragmentacji na szereg aktywnych białek. Poznane sekwencje tych ORF wykazały istotną homologię do RNA zależnej polimerazy RNA (RDRP) potywirusów [51].

Liczne dsRNA zaobserwowano także u wielu gatunków glonów. Szczególnie interesująca sytuacja ma miejsce u *Bryopsis*, gdyż gatunki tej klasy zawierają dsRNA zarówno w mitochondriach jak i chloroplastach. W obu tych organellach występują cząsteczek o różnej długości oraz sekwencji nukleotydowej, które tworzą kompleksy z białkami tworząc struktury wirusopodobne [52, 5].

Cząsteczki plazmidów RNA występują także u wielu gatunków roślin wyższych [53, 54]. W większości przypadków nie jest znana ich lokalizacja subkomórkowa. Z całą pewnością korekty wymagają informacje, o mitochondrialnym pochodzeniu wielu roślinnych plazmidów RNA, gdyż mogą być one dziedziczone zarówno matecznie jak i ojcowsko [55].

Jedynym gatunkiem, co do którego wszystkie dane wskazują jednoznacznie na mitochondrialną lokalizację plazmidów RNA, jest kukurydza [56]. Cząsteczki te były obiektem wnikliwych badań, gdyż podobnie jak w przypadku dsRNA *Phaseolus vulgaris* [57], ich występowanie wykazywało korelacje ze zjawiskiem cytoplazmatycznej męskiej sterility (CMS). Z czterech głównych typów cytoplazmy kukurydzy (C, T, S i N), dsRNA (LBN-1, LBN-2) w znaczących ilościach występują tylko w typie L (podgrupa typu S), a ssRNA (S/RU RNAa, S/RU RNAb) w typie S i RU (podgrupa typu N) [58]. Zastosowanie czulszych metod identyfikacji wykazało jednak, że cząsteczki te występują także w pozostałych typach cytoplazm, lecz w znacznie mniejszych ilościach [59]. Pomimo że nie znana jest pełna sekwencja nukleotydoowa tych plazmidów, to podejrzewa się, że we wszystkich tych przypadkach mamy do czynienia z różnymi formami pochodzącymi od tej samej cząsteczki. Plazmidy S/RU RNAa i S/RU RNAb są bowiem jednoniciowymi formami dwuniciowych plazmidów LBN-1 i LBN-2. Natomiast cząsteczki mniejsze są prawdopodobnie delecyjnymi formami odpowiednich cząsteczek dłuższych [60]. Należy ponadto zwrócić uwagę na fakt, że w wielu eksperymentach cząsteczki jednoniciowe wykazują właściwości cząsteczek dwuniciowych, co jest wynikiem bogatej struktury drugorzędowej, powstającej przez parowanie komplementarnych fragmentów nici RNA [9].

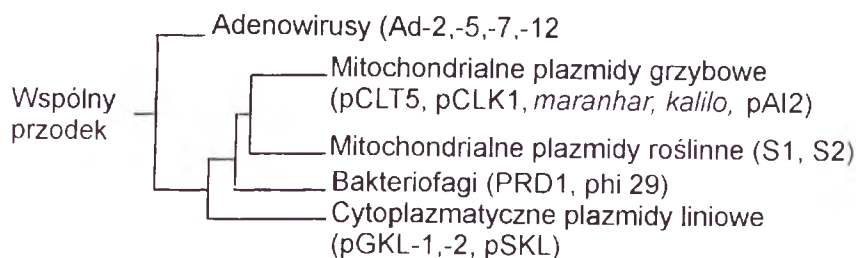
Ryż jest drugim, obok kukurydzy, gatunkiem którego plazmidy RNA były obiektem wnikliwych badań. Zawiera on liczne (ok. 100 kopii na komórkę), cytoplazmatyczne cząsteczki dsRNA charakteryzujące się stosunkowo dużymi rozmiarami. Liniowy plazmid o wielkości 13952 pz. zawiera jedną z najdłuższych spośród znanych u roślin, ORF [54]. Obejmuje ona niemal całą cząsteczkę (13716 pz) i koduje enzymy zaangażowane we własną ekspresję, czyli RDRP i helikazę.

IV. Ewolucja plazmidów eukariotycznych

Do chwili obecnej zgromadzono obszerny materiał opisowy dotyczący plazmidów eukariotycznych. Pomimo, że dane te odnoszą się do stosunkowo niewielkiej ilości gatunków, głównie o znaczeniu ekonomicznym, to pozwalają one na wyciągnięcie szeregu interesujących wniosków dotyczących ewolucji tego typu cząsteczek.

Analiza struktury i sekwencji nukleotydowej wskazuje na związek plazmidów DNA o budowie in-

wertronów z adenowirusami i bakteriofagami, niektórych mitochondrialnych plazmidów kolistych z retrowirusami, a plazmidów dsRNA z wirusami roślinnymi, głównie potywirusami. Pomimo, że fakty te wskazują na wirusowe pochodzenie plazmidów, to teza ta nie jest przyjmowana bezkrytycznie. Biorąc pod uwagę to, że pochodzenie wirusów wciąż nie jest poznane, nie można całkowicie wykluczyć hipotezy która przyjmuje, że przynajmniej niektóre plazmidy są formami pośrednimi w trakcie wyodrębniania się sekwencji chromosomalnych do postaci niezależnych replikonów, a następnie form o charakterze wirusowym. Przypuszcza się, że przykładem tego typu procesu mogą być mitochondrialne plazmidy kolisty roślin, ze względu na częste występowanie sekwencji homologicznych z jądrowym DNA [9]. Ponadto podobieństwo strukturalne niektórych cząsteczek, np. plazmidów liniowych z adenowirusami i bakteriofagami, może być wynikiem konwergencji a nie wspólnego pochodzenia [61]. Tezę tą wspierają niektóre dane sekwencyjne, wskazujące na brak istotnych homologii sekwencji pomiędzy inwertronami plazmidowymi a znanymi adenowirusami (Ryc. 3) [62]. Zdecydowana większość danych



Ryc. 3. Dendrogram obrazujący pokrewieństwo występujące pomiędzy różnymi inwertronami, określone na podstawie stopnia homologii sekwencji genów polimerazy DNA i RNA [68].

wskazuje jednak na wirusowe pochodzenie plazmidów eukariotycznych. Po pierwsze, stopień homologii sekwencji nukleotydowej większości plazmidów z genomem gatunków gospodarza i gatunków blisko z nim spokrewnionych, jest stosunkowo ograniczony. Ponadto sekwencje zawarte w plazmidach tworzą funkcjonalną całość, w przeciwieństwie do homologicznych, obecnych w chromosomach, które na ogół są wynikiem integracji plazmidu na drodze rekombinacji [63, 64] (Ryc. 2B).

Założenie o wirusowym pochodzeniu plazmidów implikuje szereg dodatkowych pytań. Jedno z nich dotyczy lokalizacji subkomórkowej plazmidów. Zdecydowana większość plazmidów została do tej pory zidentyfikowana w mitochondriach. Ponieważ nie wiadomo jaka jest tego przyczyna, można wysunąć trzy, nie wykluczające się hipotezy. Po pierwsze, w mitochondriach roślin i grzybów brak jest

czynnika eliminującego tego typu dodatkowy materiał genetyczny. Po drugie, obecność plazmidów może mieć związek z istniejącym mechanizmem importu kwasów nukleinowych z cytoplazmy do mitochondrium. Aczkolwiek mechanizm ten jest bardzo słabo poznany, jego obecność nie budzi wątpliwości ze względu na fakt, że niektóre cząsteczki tRNA muszą być importowane przez mitochondrium z jądra komórkowego [65]. W wyjątkowych przypadkach mechanizm ten mógłby być wykorzystywany przez niektóre wirusy RNA lub retrowirusy, które tą drogą mogłyby wnikać do mitochondriów. Po trzecie, obecność plazmidów w mitochondriach może mieć związek z prokariotycznym pochodzeniem tych organelli [66]. Zakładając bowiem, że wiele plazmidów pochodzi od bakteriofagów, organelle te stanowią dla nich dogodne środowisko, sprzyjające ich utrzymaniu.

Kolejne pytanie dotyczy pokrewieństwa pomiędzy plazmidami występującymi w różnych przedziałach komórkowych [67]. Porównanie sekwencji nukleotydowych różnych inwertronów wskazuje na bliższy stopień pokrewieństwa pomiędzy bakteriofagami a plazmidami mitochondrialnymi roślin i grzy-

bów, aniżeli którejkolwiek z tych grup z plazmidami cytoplazmatycznymi [68] (Ryc. 3). Fakt ten świadczy niewątpliwie o dużej zachowawczości subkomórkowej plazmidów poszczególnych przedziałów komórkowych.

Interesująca jest również kwestia stabilności plazmidów w obrębie danego gatunku. By rozwiązać ten problem, należy udzielić odpowiedzi na następujące pytania. Na jakim etapie filogenezy danego gatunku doszło do jego zasiedlenia przez wirusy z których powstały plazmidy? Jakie są mechanizmy ich dalszej propagacji? Jakim przekształceniom cząsteczki te podlegały w procesie dalszej ewolucji? Liczne dane, dotyczące występowania poszczególnych plazmidów w obrębie danej jednostki systematycznej, pozwalają stosunkowo precyzyjnie odpowiedzieć na pierwsze z tych pytań. Np. w przypadku niektórych plazmidów roślinnych, takich jak plazmi-

dy lubinu białego [40], które występują w mitochondriach wszystkich odmian jednego gatunku w obrębie danego rodzaju, można przyjąć, że zasiedlenie przez formy wirusowe nastąpiło we wczesnym etapie specjacji.

Jednak rozprzestrzenienie niektórych plazmidów w obrębie różnych jednostek systematycznych, w kilku przypadkach jest większe, niż by to wynikało z założenia o istnieniu wspólnego przodka. Jeden z mitochondrialnych plazmidów kolistych o wielkości 5,2 tpz zasiedla trzy różne gatunki: *Neurospora crassa*, *N.intermedia* i *N.tetrasperme*. Badania restrykcyjne wykazały, że zmienność występująca w obrębie tych plazmidów jest znacznie mniejsza niż zmienność obserwowana pomiędzy tymi gatunkami [69]. Zaobserwowano także, że plazmid *kalilo* może zasiedlać mitochondria przedstawicieli dwóch rodzajów — *Neurospora* i *Gelasinospora* [70]. Poprawna interpretacja takiej dystrybucji plazmidów w obrębie gatunków grzybów wymaga uwzględnienia różnych mechanizmów rozprzestrzeniania tych cząsteczek. W powyższych przypadkach można założyć, że oprócz typowego dla mitochondriów pionowego dziedziczenia matecznego, dochodzi również do przenoszenia horyzontalnego [71]. Możliwość taka została potwierdzona w badaniach laboratoryjnych w których wykazano, że możliwe jest przeniesienie plazmidów z *Ascobolus immersus* do *Podospora anserina*, poprzez kontakt cytoplazm przedstawicieli obu gatunków [71].

Zasięg horyzontalnego transferu plazmidów eukariotycznych może być jednak znacznie szerszy, aniżeli w poznanych przykładach międzygatunkowych krzyżówek grzybów, w obrębie jednego lub dwóch rodzajów [72]. Fakt, że wiele plazmidów egzystuje w szczepach grzybów patogennych lub symbiotycznych w stosunku do roślin, zwraca uwagę na możliwość horyzontalnego transferu tych cząsteczek także pomiędzy tymi podkrólestwami. Możliwość taką potwierdzają wyniki analizy sekwencyjnej wskazujące na wyższy stopień pokrewieństwa pomiędzy niektórymi plazmidami mitochondrialnymi roślin i grzybów, np. *S1* i *kalilo*, aniżeli pomiędzy tymi plazmidami a bakteriofagami, od których cząsteczki te najprawdopodobniej wywodzą się [61] (Ryc.3).

Zakładając, że większość plazmidów pochodzi od wirusów, należy przyjąć że jednym z podstawowych trendów ewolucyjnych, którym cząsteczki te podlegają po zasiedleniu gatunków eukariotycznych, jest utrata sekwencji zbędnych w warunkach trwałego egzystowania na terenie komórek. Dotyczy to głównie sekwencji kodujących białka kapsydowe, któ-

rych brak jest u zdecydowanej większości plazmidów oraz innych genów odpowiedzialnych za zdolność do infekcji. Ograniczanie wielkości cząsteczek DNA lub RNA stanowi prawdopodobnie istotną cechę adaptacyjną plazmidów mitochondrialnych, dla których tempo replikacji ma zasadnicze znaczenie dla utrzymania się w tych organellach.

Analiza polimeraz DNA i RNA kodowanych przez plazmidy nasuwa kilka interesujących spostrzeżeń. Z ewolucyjnego punktu widzenia szczególnie istotny jest fakt, że niektóre plazmidy zasiedlające gatunki eukariotyczne, np. Mauricevilla i Varkud, kodują odwrotną transkryptazę, której aktywność może prowadzić do powstawania elementów retrotranspozonowych. Proces ten ma istotne znaczenie ewolucyjne dla gospodarza plazmidów, gdyż aktywność odwrotnej transkryptazy może prowadzić do indukowania istotnych rearanżacji w obrębie ich genomu. Z ewolucyjnego punktu widzenia ciekawy jest również przykład polimerazy DNA kodowanej przez plazmid LaBelle. Ponieważ białko to zawiera bloki sekwencji homologicznych do RT-polimerazy, niektórzy autorzy uważają, że stanowi ona przykład ewolucji molekularnej obrazującej przejście ze „świata RNA” do „świata DNA” [38]. Ponieważ jednak wydarzenie to miało miejsce co najmniej 2 miliardy lat temu, jest mało prawdopodobne by plazmid LaBelle był reliktem z tego okresu.

Innym interesującym zagadnieniem jest podobieństwo polimeraz RNA kodowanych przez niektóre plazmidy liniowe i bakteriofagi z polimerazami RNA zasadniczego genomu mitochondrialnego [73]. Pomimo, że w chwili obecnej nie wiadomo, jaki związek ewolucyjny ono odzwierciedla, to z pewnością fakt ten musi zostać uwzględniony w rozważaniach dotyczących pochodzenia mitochondriów.

Zasadniczym problemem jaki stoi przed badaczami zajmującymi się plazmidami eukariotycznymi jest poznanie funkcji tych cząsteczek. Problem ten w kategoriach ewolucyjnych sprowadza się do poznania kryterium adaptacyjnego które powoduje, że cząsteczki te są stosunkowo stabilnym elementem genetycznym organizmów eukariotycznych. Pomimo, że do chwili obecnej zidentyfikowano wiele plazmidów, występujących u przedstawicieli różnych gatunków, to poznane i przedstawione powyżej przykłady dotyczące ich funkcji są stosunkowo nieliczne. Istnieją trzy zasadnicze koncepcje dotyczące tej kwestii.

Pierwsza z nich zakłada, że plazmidy w zdecydowanej większości wywierają zasadniczo negatywny wpływ na organizm gospodarza. Do najlepiej poznanych przykładów oddziaływań ujemnych należy pro-

ces starzenia indukowany lub inhibowany przez niektóre plazmidy oraz osłabienie wirulencji szczepów gospodarza. W tego typu przypadkach, niektórzy autorzy uważają, że cząsteczki te są przykładem „paraszytów molekularnych” [10]. Także w sytuacji gdy nie obserwuje się wyraźnego związku pomiędzy obecnością plazmidu a cechą fenotypową można przyjąć, że konieczność utrzymania znacznej ilości kopii plazmidów ulegających intensywnej transkrypcji, niewątpliwie obciąża bilans energetyczny gospodarza.

Koncepcja druga sugeruje, że obecność zdecydowanej większości plazmidów jest obojętna dla organizmu gospodarza i jak twierdzi wielu autorów, cząsteczki te reprezentują typowy tzw. „samolubny DNA” (ang. *selfish DNA*), którego ewolucja ukierunkowana jest wyłącznie na własne przetrwanie [10]. W tym znaczeniu, plazmidy wykazują analogię do licznych sekwencji powtórzonych, obecnych w chromosomach większości *Eukaryota* [1]. Zwolennicy tezy o neutralnym stosunku plazmidowych dla gospodarza, powołują się na fakt, że obecność większości plazmidów nie koreluje z żadnymi obserwowanymi cechami gospodarza. Fenotypy szczepów grzybów zasiedlanych przez poszczególne plazmidy w niczym nie różni się od fenotypów szczepów blisko z nimi spokrewnionych, lecz pozbawionych tego typu cząsteczek.

Trzecia koncepcja sugeruje natomiast istnienie pozytywnego wpływu plazmidów na organizm gospodarza. Pomimo że poznano niewiele przykładów tego typu funkcji, to tezę tą wspiera kilka istotnych faktów. Pierwszym z nich jest ewolucyjna trwałość plazmidów, pomimo występowania w postaci niezależnych replikonów. Mechanizm selekcji cząsteczek DNA podczas podziałów mitochondriów, oraz segregacji tych organelli podczas podziałów komórkowych, doprowadzić powinien do szybkiego usunięcia niezależnych replikonów, nie posiadających żadnej funkcji adaptacyjnej. Zjawisko tego typu często obserwuje się przy próbach transformacji organelli, podczas których bardzo łatwo dochodzi do usunięcia transgenów, jeżeli nie są one nosicielami silnego czynnika selekcyjnego [74]. Tymczasem plazmidy są cząsteczkami stosunkowo stabilnymi w obrębie różnych jednostek systematycznych. Kolejnym, istotnym argumentem na rzecz pozytywnej funkcji plazmidów jest fakt, że większość plazmidów występuje w dzikich szczepach grzybów, podczas gdy szczepy laboratoryjne, od lat utrzymywane w optymalnych warunkach wzrostu, na ogół nie posiadają tego typu elementów genetycznych. Fakt ten

wytłumaczyć można jedynie brakiem presji selekcyjnej w warunkach hodowlanych, która prowadzi do eliminacji zbytecznych plazmidów.

V. Podsumowanie

1. Organizmy eukariotyczne, obok innych pozachromosomalnych elementów genetycznych, zawierają cząsteczki DNA i RNA charakteryzujące się cechami typowymi dla plazmidów.

2. Plazmidy eukariotyczne występują u wielu gatunków grzybów, niektórych gatunków roślin i bardzo rzadko u zwierząt.

3. Większość plazmidów eukariotycznych zlokalizowana jest w mitochondriach. Niektóre typy plazmidów obecne są w cytoplazmie i w bardzo rzadkich przypadkach na terenie jądra komórkowego lub chloroplastów.

4. Plazmidy DNA mają budowę liniową lub kolistą. Większość plazmidów liniowych posiada budowę typową dla inwertronów. Plazmidy koliste charakteryzują się większą zmiennością pod względem organizacji genetycznej. Plazmidy RNA są grupą cząsteczek wykazujących najwięcej cech wspólnych z wirusami.

5. Plazmidy występują także w różnych modyfikacjach, będących następstwem błędów zachodzących podczas replikacji lub wynikiem integracji z genomem mitochondrialnym.

6. Analiza sekwencji i organizacji genetycznej wielu plazmidów sugeruje, że powstały one na skutek trwałego zasiedlenia organizmów eukariotycznych przez wirusy.

7. Plazmidy ulegały dalszej ewolucji polegającej na redukcji materiału genetycznego, zbędnego w warunkach trwałego egzystowania w komórkach. Niektóre plazmidy ewoluowały w kierunku tworzenia form episomalnych, mobilnych lub trwale zintegrowanych z genomem gospodarza.

8. Rozprzestrzenienie plazmidów uwarunkowane jest ich historią ewolucyjną, dziedziczeniem pionowym oraz w niektórych przypadkach zdolnością do przenoszenia horyzontalnego.

9. Związek plazmidów z fenotypem gospodarza zidentyfikowano tylko w kilku przypadkach. Funkcja większości z nich, pozostaje w dalszym ciągu nie wyjaśniona.

Podziękowania

Praca w części finansowana w ramach projektu naukowo-badawczego KBN 6P04B01813.

Piśmiennictwo

- Gaubatz JW (1990) *Mutation Res* **237**: 271-292
- Buchowicz J (1997) *Acta Biochim Polon* **44**: 13-9
- Actis LA, Tolmasky ME, Crosa JII (1999) *Front Bio-sci* **4**: D43-62
- Gonzales CM, Spencer TD, Pendley SS, Welker DL (1999) *Plasmid* **41**: 89-96
- Koga R, Fukuhara T, Nitta T (1998) *Plant Mol Biol* **36**: 717-24
- Gillham NW (1994) *Organelle Genes Genomes*, Oxford University Press, New York
- Ray DS (1987) *Plasmid* **17**: 177-190
- Endoh H, Yazaki K, Takahashi M, Tsukii Y (1994) *Curr Genet* **27**: 90-94
- Levings CS, Vasil IK (1995) *The Molecular Biology of Plant Mitochondria*, Kluwer Academic Publisher
- Griffiths AJ (1995) *Microbiol Rev* **59**: 673-85
- Ludwig DL, Bruschi CV (1991) *Plasmid* **25**: 81-95
- Kiyosawa H, Hughes JE, Podgorski GJ, Welker DL (1993) *Plasmid* **30**: 106-118
- Meinhardt F, Schaffrath R, Larsen M (1997) *Appl Microbiol Biotechnol* **47**:329-36
- Sakaguchi K (1990) *Microbiol Rev* **54**:66-74
- Kuzmin EV, Levchenko IV (1987) *Nucl Acids Res* **15**: 6758-6760
- Kempken F, Meinhardt F, Esser K (1989) *Mol Gen Ge-net* **218**: 523-530
- Hermanns J, Osiewacz HD (1992) *Curr Genet* **22**: 491-500
- Takano H, Kuroiwa T, Kawano S (1997) *Cell Struct Funct* **22**:299-308
- Leon P, Walbot V, Bedinger P (1989) *Nucleic Acids Res* **17**:4089-99
- Fukuhara H (1995) *FEMS Microbiol Lett* **131**:1-9
- Worsham PL, Bolen PL (1990) *Curr Genet* **18**:77-80
- Schickel J, Helmig C, Meinhardt F (1996) *Nucleic Acids Res* **24**:1879-1886
- Hayman GT, Bolen PL (1991) *Curr Genet* **19**: 389-393
- Endoh H, Yazaki K, Takahashi M, Tsukii Y (1994) *Curr Genet* **27**:90-4
- Tsuki Y (1994) *Jpn J Genet* **69**: 307-319
- Hermanns J, Asseburg A, Osiewacz HD (1995) *Curr Genet* **27**: 379-386
- Vierula PJ, Bertrand H (1992) *Mol Gen Genet* **234**: 361-368
- Court DA, Bertrand H (1993) *Plasmid* **30**: 51-66
- Hermanns J, Osiewacz HD (1996) *Curr Genet* **29**: 250-256
- Houchins JP, Ginsburg H, Rohrbaugh M, Dale RM, Schardl CL, Hodge TP, Lonsdale DM (1986) *EMBO J* **5**:2781-2788
- Myers CJ, Griffiths AJ, Bertrand H (1989) *Mol Gen Genet* **220**:113-120
- Kemble RJ, Mans RJ (1983) *J Mol Appl Genet* **2**:161-171
- Escote LJ, Gabay-Laughnan SJ, Laughnan JR (1985) *Plasmid* **14**:264-7
- Garcia JA Jr, Kolacz K, Studnicka GM, Gilmore-Hebert M (1988) *Nucleic Acids Res* **16**:4169-70
- Levings CS, Brown GG (1989) *Cell* **56**:171-9
- Kim BD, Mans RJ, Conde MF, Pring DR, Levings CS (1982) *Plasmid* **7**:1-14
- Chiang CC, Kennell JC, Wanner LA, Lambowitz AM (1994) *Mol Cell Biol* **14**:6419-32
- Nargang FE, Pande S, Kennell JC, Akins RA, Lamboowitz AM (1992) *Nucleic Acids Res* **20**: 1101-1108
- Wang H, Lambowitz AM (1993) *J Biol Chem* **268**:18951-9
- Gorączniak RM, Augustyniak H (1991) *Plant Sci* **79**: 173-179
- Wahleithner JA, Wolstenholme DR (1988) *Curr Ge-net* **14**: 163-170
- Backert S, Kunnimalaiyaan M, Borner T, Niel-sen BL (1998) *J Mol Biol* **284**:1005-15
- Gorączniak RM, Augustyniak H (1989) *Curr Genet* **16**:469-71
- Arganoza MT, Akins RA (1995) *Curr Genet* **29**:34-43
- Benslimane AA, Hartmann C, Ouenzar B, Rode A (1996) *Curr Genet* **29**:591-3
- El-Sherbeini M, Tipper DJ, Mitchell DJ, Bo-stian KA (1984) *Mol Cell Biol* **4**: 2818-2827
- Koga R, Fukuhara T, Nitta T (1998) *Plant Mol Biol* **36**:717-24
- Esteban LM, Rodriguez-Cousino N, Esteban R (1992) *J Biol Chem* **267**: 10874-10881
- Cansado J, Velazquez JB, Calo P, Siciro C, Lon-go E, Villa TG (1992) *FEMS Microbiol Lett* **76**:13-17
- Polashock JJ, Hillman BI (1994) *Proc Natl Acad Sci USA* **91**:8680-4
- Lee S, Fernando MA (1999) *J Parasitol* **85**:208-12
- Ishihara J, Pak YJ, Fukuhara T, Nitta T (1992) *Plan-ta* **187**: 475-482
- Moriyama H, Nitta T, Fukuchara T (1995) *Mol Gen Genet* **248**:364-369
- Moriyama H, Horiuchi H, Nitta T, Fukuhara T (1999) *Plant Mol Biol* **39**:1127-36
- Moriyama H, Kanaya K, Wang JZ, Nitta T, Mo-riyama H (1996) *Plant Mol Biol* **31**: 713-719
- Osaki H, Kudo A, Ohtsu Y (1998) *Biosci Biotechnol Bio-chem* **62**:2101-6
- Mackenzie SA (1991) *Genetics* **127**:411-6
- Brown GG, Finnegan PM (1989) *Int Rev Cytol* **117**:1-56
- Zhang M, Brown (1993) *J Mol Biol* **230**: 757-765
- Levings CS, Brown GG (1989) *Cell* **56**:171-9
- Kempken F, Hermanns J, Osiewacz HD (1992) *J Mol Evol* **35**:502-513
- Rohe M, Schrunder J, Tudzynski P, Meinhardt F (1992) *Curr Genet* **21**:173-176
- Robison MM, Horgen PA (1996) *Curr Genet* **29**:370-6
- Oeser B, Rogmann-Backwinkel P, Tudzynski P (1993) *Curr Genet* **23**:315-22
- Tarassov JA, Martin RP (1996) *Biochimie* **78**:502-10
- Woese CR, Kandler O, Wheelis ML (1990) *Proc Natl Acad Sci USA* **87**:4576-4579
- Blaissoneau J, Nosek J, Fukuhara H (1999) *Yeast* **15**:781-91
- Sakaguchi K (1990) *Microbiol Rev* **54**:66-74
- Taylor JW, Smolich BD, May G (1985) *Mol Gen Genet* **201**:161-167
- Yuewang W, Yang X, Griffiths AJ (1996) *Curr Genet* **29**:150-8
- Kempken F (1995) *Mol Gen Genet* **248**:89-94
- Robison MM, Horgen PA (1999) *Fungal Genet Biol* **26**:62-70
- Hedtke B, Borner T, Weihe A (1997) *Science* **277**: 809-811
- Maliga P, Carrer H, Kanevski I, Staub J, Svab Z (1993) *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **342**:203-8

Mechanizm oporności na związki arsenu u prokaryontów i eukaryontów

Mechanism of arsenic compounds resistance in prokaryotes and eukaryotes

ROBERT WYSOCKI¹, PIOTR BOBROWICZ¹,
STANISŁAW UŁASZEWSKI²

Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Właściwości chemiczne związków arsenu
- III. Właściwości biologiczne soli arsenu
- IV. Zjawisko oporności organizmów na związki arsenu
 - IV-1. Operon *ars* u prokaryontów
 - IV-2. Mechanizm oporności drożdży *Saccharomyces cerevisiae* na sole arsenu
 - IV-3. Zjawisko oporności pasożytniczych pierwotniaków na związki arsenu i antymonu
 - IV-4. Terapia arsenikowa w białaczce promielocytowej a oporność komórek ssaków na związki arsenu

Wykaz stosowanych skrótów: ABC — domena przyłączania ATP, ATP — adenosynotrifosforan, As(GS)₃ — koniugat arsenu z glutationem, GR — reduktaza glutaredoksynowa, Grx — glutaredoksyna, GSH — glutation, GSSG — disiarczek glutationu, NADPH — fosforan dinukleotydu nikotynamidoadeninowego, ORF — otwarta ramka odczytu, ox — forma utleniona, pz — pary zasad, red — forma zredukowana, TR — reduktaza tioredoksynowa, Trx — tioredoksyna.

I. Wstęp

Związki arsenu i pokrewnego metalu antymonu były pierwszymi chemioterapeutykami stosowanymi w leczeniu chorób zakaźnych i pasożytniczych. Już prawie sto lat temu niemiecki bakteriolog i lekarz Paul Ehrlich zastosował salwarsan w leczeniu kily i śpiączki afrykańskiej [1]. W 1908 roku Paul Ehrlich został uhonorowany Nagrodą Nobla za syntezę tego arsenoorganicznego związku i stworzenie podstaw chemioterapii. Jednocześnie Ehrlich zaobserwował, że komórki chorobotwórcze szybko stawały się odporne na działanie salwarsanu.

Contents:

- I. Introduction
- II. Chemical properties of arsenic compounds
- III. Biological properties of arsenic salts
- IV. Arsenical resistance phenomenon in organisms
 - IV-1. *ars* operon in prokaryotes
 - IV-2. Mechanism of arsenic salts resistance in yeast *Saccharomyces cerevisiae*
 - IV-3. Arsenic and antimony compounds resistance phenomenon in protozoan parasites
 - IV-4. Arsenic therapy in promyelocytic leukemia and arsenical resistance in mammalian cells

Obecnie chemioterapia jest główną metodą leczenia chorób zakaźnych, pasożytniczych i nowotworowych. Powszechnie występujące zjawisko oporności na stosowane terapeutyki jest ogromnym problemem współczesnej medycyny. Aby skutecznie walczyć z tym zjawiskiem, musimy poznać najpierw molekularne mechanizmy prowadzące do wystąpienia oporności na leki.

Związki arsenu i antymonu są dzisiaj podstawowymi składnikami leków stosowanych w leczeniu śpiączki afrykańskiej i leiszmanioz [2, 3]. Z drugiej strony oporność na związki arsenu i antymonu charakteryzuje również komórki nowotworowe niewrażliwe na leki cytostatyczne [4, 5]. W związku z powyższym zrozumienie molekularnych mechanizmów oporności komórek na związki arsenu i antymonu jest niezbędne do opracowania nowych metod terapeutycznych.

II. Właściwości chemiczne związków arsenu

Arsen jest pierwiastkiem piątej grupy głównej układu okresowego i ma charakter półmetaliczny. Arsen tworzy związki chemiczne w stopniu utlenienia -3, +3 i +5. W przyrodzie występują dwa podstawowe tlenki arsenu: As₂O₃ i As₂O₅. Trójtlenek arse-

¹Dr, ²prof. dr hab.; ^{1,2}Zakład Genetyki, Instytut Mikrobiologii, Uniwersytet Wrocławski, ul. Przybyszewskiego 63/77, 51-148 Wrocław

nu, zwany też arsenikiem, jest silnie trujący i był stosowany do celów skrytobójczych już w starożytności. Arsenik słabo rozpuszcza się w wodzie, tworząc przy tym jony kwasu *orto*-arsenawego (H_3AsO_3) i *meta*-arsenawego (HAsO_2). Przy neutralnym pH kwas arsenawy występuje głównie w formie nie zjonizowanej $\text{As}(\text{OH})_3$ [6]. Kwas arsenawy tworzy sole jednozasadowe, dwuzasadowe i trójzasadowe. Przykładem może być *meta*-arsenin sodowy (NaAsO_2) używany jako środek owado- i chwastobójczy. Pięciotlenek arsenu bardzo łatwo rozpuszcza się w wodzie. W neutralnym pH występują w równej ilości jony HAsO_4^{2-} i H_2AsO_4^- kwasu *orto*-arsenowego (H_3AsO_4). Sole kwasu *orto*-arsenowego znalazły zastosowanie jako środki owadobójcze i herbicydy [7].

Organiczne związki arsenu mogą mieć budowę łańcuchową lub pierścieniową, przy czym arsen wchodzący w skład związku może być trój- lub pięciowartościowy. Arsen pięciowartościowy może tworzyć kwas fenylarsenowy i difenylarsenowy, a trójwartościowy arsenobenzen. Pochodne arsenobenzeny i kwasu fenylarsenowego znalazły zastosowanie w leczeniu chorób inwazyjnych spowodowanych przez krętki, trypanosomy i pełzaki. Aminohydroksypochodną arsenobenzeny jest wspomniany już wcześniej salwarsan.

III. Właściwości biologiczne soli arsenu

Toksyczność arsenu jest w dużym stopniu zależna od stopnia jego utlenienia. Arsenin sodowy jest od 10 do 100 razy bardziej toksyczny niż arsenian sodowy [8]. Toksyczność arseninu jest spowodowana jego zdolnością do reagowania z grupami tiolowymi w białkach [9]. Ponadto arsenian jest toksycznym analogiem fosforanu i konkuruje z Pi podczas aktywnego transportu przez błony komórkowe do wnętrza komórki [10] oraz w reakcjach fosforylacji, tworząc niestabilne arsenowe pochodne [11].

Związki arsenu są także czynnikami stresu komórkowego i indukują syntezę białek stresowych, podobnie jak to ma miejsce w przypadku szoku termicznego [12, 13]. Arsenin, podobnie jak szok termiczny, aktywuje w ludzkich komórkach nowotworowych ekspresję genu *MDR1*, kodującego P-glikoproteinę warunkującą wielolekową oporność na cytostatyki [14]. Najsilniej hamowanym enzymem przez arsenin w komórce jest dehydrogenaza pirogronianowa [15]. Arsen znacznie zwiększa swą toksyczność w komórce przez wytwarzanie związków z reaktywnym tlenem [16]. Arsenin prawdopodobnie generuje powstawanie nadtlenu wodoru przez akty-

wację odpowiednich oksydaz flawinowych. Arsenin hamuje także reduktazę glutationową i obniża znacznie poziom glutationu w komórce [17].

Związki arsenu są karcinogenne dla człowieka, zaburzają cykl komórkowy oraz indukują cytogenetyczne zmiany w wielu systemach komórkowych. Karcinogenne właściwości arsenu trójwartościowego wynikają z jego zdolności do indukcji ekspresji genów *c-fos* i *c-jun*, kodujących czynniki stymulujące proliferację komórek [18]. Związki arsenu powodują amplifikację genów [19], powstawanie pęknięć i złamań w chromatydach [20], wymianę chromatyd siostrzanych [21], endoreduplikację chromosomów [22], aberracje chromosomowe [23].

IV. Zjawisko oporności organizmów na sole arsenu

IV-1. Operon *ars*

Konsekwencją powszechnego użycia związków arsenu w postaci herbicydów i środków owadobójczych oraz wzrastającego przemysłowego zanieczyszczenia środowiska, była uwarunkowana plazmidowo oporność na toksyczne aniony arsenianowe i arseninowe, zaobserwowana u wielu gatunków bakterii gram-dodatnich i gram-ujemnych [24]. Novick i Roth [25] po raz pierwszy wyizolowali z gram-dodatniej bakterii *Staphylococcus aureus* plazmid pI258, który warunkował oporność na wysokie stężenia soli arsenu. Podobne właściwości wykazywał plazmid R773 pochodzący z *Escherichia coli* [26]. Udowodniono, że oporność na sole arsenu zależy od aktywnego transportu jonów arsenu na zewnątrz komórki bakteryjnej [27, 28]. Analiza genetyczna i molekularna plazmidów oporności na sole arsenu wykazała, że jedna grupa genów nazwana operonem *ars*, odpowiedzialna jest za wystąpienie zjawiska oporności.

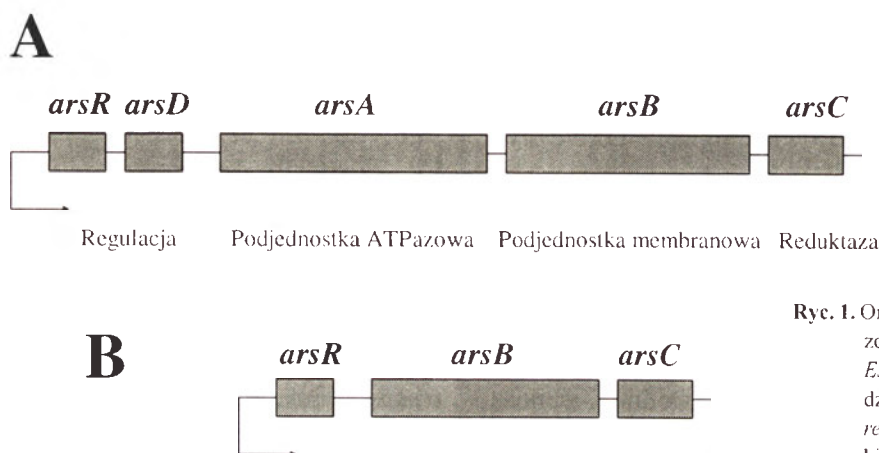
Operon *ars* zlokalizowany na plazmidzie R773 [29] składa się z pięciu genów *arsR*, *arsD*, *arsA*, *arsB* i *arsC* (Ryc. 1A). Kilka lat temu zidentyfikowano operon *ars* na chromosomie *Escherichia coli* [30]. Chromosomowa kopia operonu *ars* zawiera tylko trzy geny: *arsR*, *arsB* i *arsC*, warunkujące oporność na niskie stężenia soli arsenu [31]. Wyizolowano i określono sekwencję nukleotydową plazmidów pI258 ze *Staphylococcus aureus* [32] i pSX267 ze *Staphylococcus xylosum* [33]. Okazało się, że operon *ars* zawiera również tylko trzy geny: *arsR*, *arsB* i *arsC* (Ryc. 1B). Ponadto operony *ars* zidentyfikowano na chromosomie u *Bacillus subtilis* [34, 35] oraz na plazmidzie wirulentnym pYV izolowanym z pato-

gennych bakterii rodzaju *Yersinia* [36]. Operon *ars* warunkuje oporność nie tylko na sole arsenu pięciowartościowego i trójwartościowego, ale także na sole antymonu [24].

Najlepiej poznanym pod względem molekularnym jest operon *ars* zlokalizowany na plazmidzie oporności R773 [29]. Składa się on z pięciu genów ułożonych w następującej kolejności: *arsR*, *arsD*, *arsA*, *arsB* i *arsC* (Ryc. 1). Ekspresja operonu *ars*

Oporność na sole arsenu i antymonu kodowana plazmidowo w komórkach *Escherichia coli* jest warunkowana istnieniem ATP-zależnej pompy anionowej, usuwającej toksyczne metale na zewnątrz komórki (Ryc. 2A). Pompa ta zbudowana jest z dwóch podjednostek kodowanych przez geny *arsA* i *arsB* z operonu *ars* (Ryc. 1).

Białko ArsA złożone jest z dwóch homologicznych części: N-końcowej A1 i C-końcowej A2 [29].



Ryc. 1. Organizacja operonu *ars* zlokalizowanego na plazmidzie R773 z *Escherichia coli* (A) i plazmidzie pI258 z *Staphylococcus aureus* (B). Strzałkami zaznaczono kierunek transkrypcji operonu.

jest regulowana przez sole metali ciężkich: arsenu, antymonu i bizmutu [24, 37]. Region operonu niezbędny do jego regulacji obejmuje pojedynczą sekwencję promotorową oraz dwa geny regulatorowe *arsR* i *arsD* [33, 38, 39]. Gen *arsR* koduje białko represora, które przyłącza się jako homodimer do operatora w pozycji -35 przed promotorem *ars* i w ten sposób uniemożliwia transkrypcję operonu *ars* [40]. Arsenin i antymonin powodują odłączanie się białka represora od operatora, a przez to powodują indukcję ekspresji operonu *ars* [38].

W operonie *ars* drugi w kolejności gen *arsD* koduje również białko represorowe [39]. ArsD przyłącza się do tego samego operatora, co białko ArsR, ale z dwukrotnie mniejszą siłą [41]. ArsD odłącza się od operatora, podobnie jak ArsR, pod wpływem arseninu, winianu antymonylo-potasowego i tlenku fenylarsynowego [41]. Do odłączenia ArsR od operatora wystarcza stężenie 10 μ M arseninu, podczas gdy w przypadku ArsD potrzebne jest aż 100 μ M arseninu [41]. Wynika z tego, że ArsR charakteryzuje się znacznie silniejszym powinowactwem do induktorów niż białko ArsD. Na podstawie powyższych danych sformułowano szczegółowy model regulacji operonu *ars*. Tak więc ArsR kontroluje ekspresję genów strukturalnych operonu *ars* na poziomie podstawowym tj. przy niskich stężeniach arsenu, a ArsD kontroluje maksymalny poziom ekspresji przy wysokich stężeniach toksycznych metali [41].

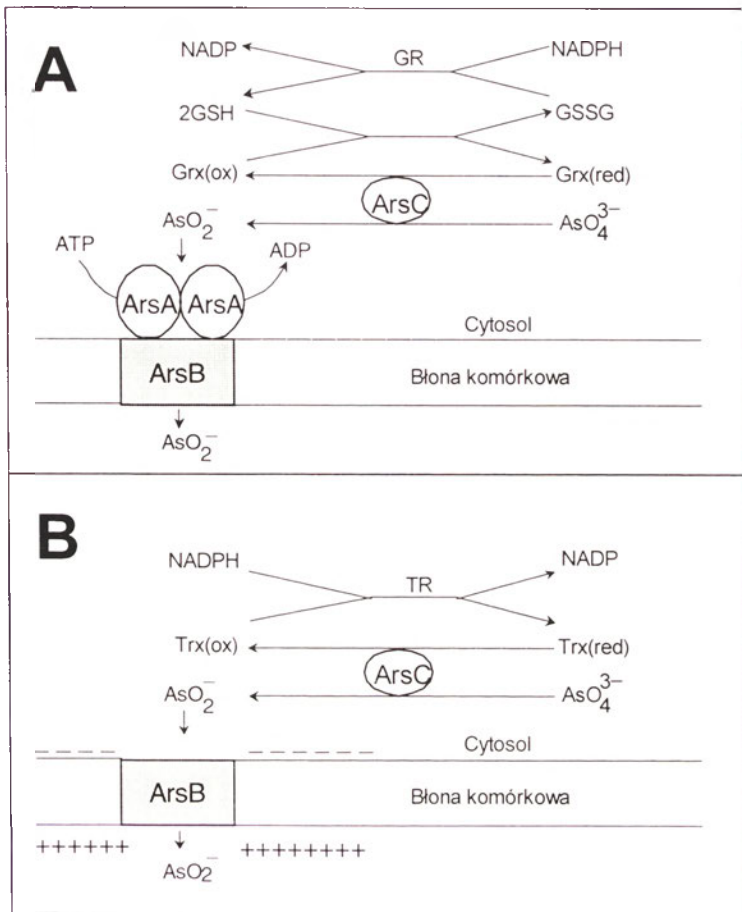
Każda z nich zawiera konserwatywną sekwencję wiązania ATP [42], nazwaną odpowiednio miejscem A1 i A2. Oczyszczone białko ArsA wykazuje *in vitro* aktywność ATPazową indukowaną arseninem i antymoninem [43]. Analiza mutacji w obrębie miejsc A1 i A2 wykazała, że obie sekwencje wiązania ATP są niezbędne dla katalitycznej aktywności ArsA i wystąpienia zjawiska oporności na sole arsenu [44]. Przy braku substratu ArsA występuje głównie jako monomer, ale w obecności arseninu lub antymoninu białko ulega dimeryzacji [45]. Aktywność ATPazowa ArsA jest również aktywowana przez te same sole metali ciężkich [43].

Drugą podjednostką ATPazy Ars stanowi białko ArsB zlokalizowane w błonie komórkowej [47] i posiadające 12 regionów transbłonowych [46]. ArsB tworzy w błonie komórkowej kanał dla oksoanionów arsenu i antymonu, a także jest miejscem przyłączenia do błony homodimeru podjednostki katalitycznej ArsA (Ryc. 2A) [48]. Badania *in vivo* i *in vitro* wykazały, że kompleks ArsA-ArsB funkcjonuje jako obligatoryjna pompa zależna od ATP [49]. Komórki posiadające funkcjonalne geny *arsA* i *arsB* wymagały do usuwania jonów arsenu tylko energii chemicznej uzyskiwanej z hydrolizy ATP [27, 50]. Sama energia elektrochemiczna była niewystarczająca dla tego procesu.

Mechanizm oporności na związki arsenu, warunkowany przez pięciogenowy (*arsR*, *arsD*, *arsA*,

arsB, *arsC*) operon *ars*, może być porównany do mechanizmu, zdeterminowanego przez operon trójgenowy (*arsR*, *arsB*, *arsC*). Chromosomowa kopia

aureus redukuje arsenian w obecności tioredoksyny (Trx), reduktazy tioredoksynowej (TR) i NADPH (Ryc. 2B) [55]. Natomiast ArsC kodowane przez pla-



Ryc. 2. Mechanizm oporności na sole arsenu w komórkach bakterii *Escherichia coli* zawierających pięciogenowy operon *ars* na plazmidzie R773(A) i *Staphylococcus aureus* zawierających trójgenowy operon *ars* na plazmidzie pI258 (B).

operonu *ars* u *Escherichia coli* oraz operon *ars* znaleziony na plazmidach bakterii gram-dodatnich nie posiadają genu *arsA*, a mimo to umożliwiają usuwanie z komórki jonów arsenu i antymonu. Broer i wsp. [51] wykazali usuwanie jonów arsenu zależne tylko od energii elektrochemicznej w komórkach *Staphylococcus aureus*, zawierających na plazmidzie operon *ars*. Podobne zjawisko zaobserwowano w komórkach *Escherichia coli*, w których ulegał ekspresji tylko gen *arsB*, a gen *arsA* był nieobecny [52]. Powyższe dane pozwoliły ustalić, że przy braku podjednostki ArsA, białko ArsB katalizuje transport arseninu z użyciem energii potencjału błonowego, prawdopodobnie jako elektroforetyczny uniporter (Ryc. 2B).

Dane genetyczne sugerowały, że oporność na arsenian zależy tylko od produktu genu *arsC* [29, 50]. Białko to zostało wyizolowane i oczyszczone stosunkowo szybko, ale jego funkcja długo pozostawała nieznana [53]. Dopiero później udowodniono, że gen *arsC* koduje reduktazę arsenianową katalizującą redukcję arsenianu do arseninu [54]. Badania *in vitro* wykazały, że oczyszczone ArsC ze *Staphylococcus*

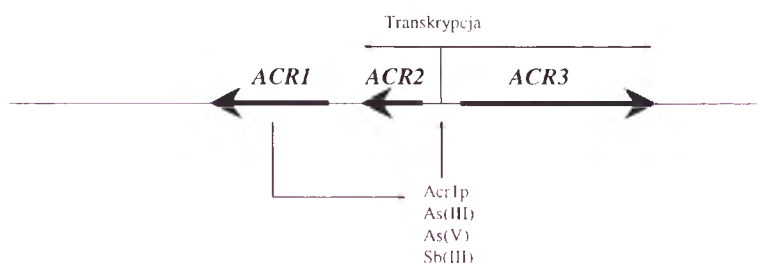
zmid R773 z *Escherichia coli* wykazuje aktywność reduktazową zależną od GSH [56]. Redukcja arsenianu do arseninu *in vitro* wymaga oprócz białka ArsC także obecności zredukowanej glutaredoksyny [Grx(red)], reduktazy glutationowej (GR) i NADPH (Ryc. 2A) [57]. Niezbędność GSH i glutaredoksyny dla aktywności katalizacyjnej ArsC może wskazywać na udział grup tiolowych w procesie redukcji arsenianu. Białko ArsC kodowane przez plazmid R773 zawiera dwie reszty cysteinowe C12 i C106 [29]. Mutagenеза ukierunkowana pokazała, że C106 nie jest niezbędna dla aktywności reduktazowej, podczas gdy zmiana C12 w inny aminokwas powoduje utratę aktywności reduktazowej i spadek oporności na arsenian [58]. Na podstawie powyższych wyników zaproponowano złożony z co najmniej czterech etapów następujący mechanizm redukcji arsenianu [57]. Jako pierwszy powstaje kompleks enzym-substrat poprzez arsenylację C12. Następnie kompleks ten reaguje ze zredukowaną formą glutaredoksyny, czemu towarzyszy transfer elektronów i redukcja arsenianu do arseninu. Powstały arsenin odłącza się z kompleksu, a zredukowana glutaredoksyna jest od-

tworzana dzięki transferowi elektronu z GSH, który z kolei jest redukowany przez reduktazę glutationową z użyciem NADPH (Ryc. 2A).

IV-2. Mechanizm oporności drożdży *Saccharomyces cerevisiae* na sole arsenu

Drożdże *Saccharomyces cerevisiae* są w wielu badaniach wykorzystywane jako modelowy organizm eukariotyczny [59, 60], dlatego poznanie mechanizmów oporności komórki drożdżowej na sole arsenu mogłoby ułatwić wyjaśnienie tego zjawiska i znalezienie podobnych genów oporności u innych eukariotów, w tym u chorobotwórczych pierwotniaków i ludzkich komórek nowotworowych.

Jeszcze do niedawna mechanizmy oporności drożdży piekarniczych na sole arsenu były prawie nieznanne. Po pierwsze wykazano, że mutacje w genach *PHO84*, -86 i -87, kodujących białka błonowe warunkujące pobieranie fosforanu nieorganicznego, powodują fenotyp oporności komórek na arsenian [61, 62]. W tym przypadku oporność jest wynikiem



Ryc. 3. Regulacja ekspresji genów *ACR2* i *ACR3*.

zablokowania drogi wnikania oksoanionów do wnętrza komórki. Oprócz powyższych nie było żadnych innych doniesień o istnieniu specyficznego dla soli arsenu mechanizmu oporności u drożdży *Saccharomyces cerevisiae*.

W Zakładzie Genetyki Instytutu Mikrobiologii Uniwersytetu Wrocławskiego kilka lat temu podjęto próbę izolacji i identyfikacji genów warunkujących oporność drożdży na sole arsenu. Z banku genów drożdżowych wyizolowano dwa fragmenty DNA o długości 4200 i 5500 pz, które w wielu kopiach nadały fenotyp bardzo wysokiego poziomu oporności drożdży *Saccharomyces cerevisiae* na arsenin sodowy [63]. Dzięki analizie sekwencji nukleotydowej wyizolowanych fragmentów stwierdzono, że zawierają one trzy sprzężone ze sobą otwarte ramki odczytu (YPR199c, YPR200c i YPR201w) o nieznanej funkcji. Zlokalizowano je na końcu prawego ramienia chromosomu XVI. Wyizolowane ORFy nazwano kolejno *ACR1* (*Arsenical Compounds Resistance*),

ACR2 i *ACR3* (Ryc. 3) [63]. Wprowadzenie do komórek drożdży wielokopijnego plazmidu zawierającego gen *ACR3* powodowało prawie 5-krotny wzrost oporności na arsenin. Natomiast nie zaobserwowano żadnych zmian w oporności komórek na arsenian. Dopiero obecność obu genów *ACR2* i *ACR3* na jednym plazmidzie wielokopijnym pozwoliła uzyskać wysoki poziom oporności komórek zarówno na arsenin, jak i na arsenian. Analiza komputerowa sekwencji aminokwasowej produktu genu *ACR3* wykazała, że ma on charakter silnie hydrofobowy, posiada od 8 do 10 potencjalnych regionów transbłonowych i prawdopodobnie zlokalizowany jest w błonie komórkowej. Białkowy produkt genu *ACR3* wykazuje duże podobieństwo do pięciu prokariotycznych białek, w tym do ArsB odpowiedzialnego za oporność komórek *Bacillus subtilis* na sole arsenu. Białka te tworzą nową rodzinę Acr3p. Delecja genu *ACR3* była przyczyną 5-krotnego wzrostu wrażliwości komórek drożdży na arsenin sodowy i 10-krotnego na arsenian sodowy [64]. Komórki zawierające wiele kopii genu *ACR3*, charakteryzowały się wysokim po-

ziomem oporności na sole arsenu i nie akumulowały radioaktywnego *ortho*-arsenu $^{76}\text{AsO}_3^{3-}$ [64]. Usuwanie arseninu z komórek mutantu *acr3::URA3* było całkowicie zahamowane; natomiast komórki z dziką kopią genu *ACR3* wykazywały wpływ izotopu arsenu. Uzyskane wyniki jednoznacznie wskazują, że białko Acr3 transportuje jony arsenu na zewnątrz komórki, co zapewnia utrzymanie nietoksycznego stężenia arsenu w cytoplazmie.

System usuwania oksoanionów arsenu z komórki przy pomocy transportera Acr3p może być wspomagany przez inne białka, np. związane ze zjawiskiem wielorakiej oporności na inhibitory, transportujące wolne aniony arsenu lub skoniugowane z glutationem na zewnątrz komórki lub do organelli komórkowych, takich jak wakuola. Niedawno wykazano, że pęcherzyki wakuolarnie, wyizolowane z komórek drożdżowych typu dzikiego lub mutantów *acr3::URA3*, akumulowały koniugaty $^{73}\text{As}(\text{GS})_3$, a transport ten był zależny od ATP [65]. Jednak nie za-

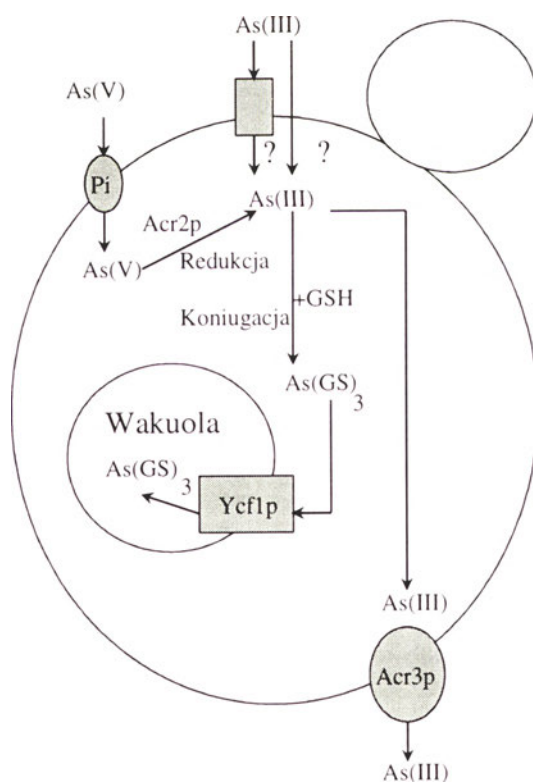
obserwowano transportu $\text{As}(\text{GS})_3$ do pęcherzyków wakuolarnych preparowanych z komórek, w których zniszczono gen *YCF1* [65]. Gen ten koduje wakuolarną pompę S-koniugatów glutationu i warunkuje oporność komórek drożdżowych na kadm [66]. Mutanty *ycf1* wykazywały wrażliwość nie tylko na kadm, ale także na arsenin, arsenian i winian antymonylo-potasowy [65]. Zatem toksyczne oksoaniony arseninowe usuwane są z cytoplazmy komórki drożdżowej co najmniej dwiema drogami: jako S-koniugaty glutationu do wakuoli za pośrednictwem ATP-zależnej pompy Ycf1p oraz na zewnątrz komórki przy udziale transportera Acr3p.

Nadekspresja genu *ACR3* powodowała fenotyp oporności tylko na wysokie stężenia soli arsenu trójwartościowego. Dopiero amplifikacja genu *ACR3* łącznie z genem *ACR2* pozwalała uzyskać komórkom oporność również na arsenian [63]. Na podstawie powyższych wyników wysunięto roboczą hipotezę, że gen *ACR2* koduje reduktazę arsenianową, która warunkuje przemianę arsenu pięciwartościowego w formę trójwartościową, usuwaną z komórki przez białko Acr3p [63]. Gen *ACR2* został poddany analizie funkcjonalnej i okazało się, że komórki szczepu mutanta ze zniszczoną kopią genu *ACR2* charakteryzowały się tylko zwiększoną wrażliwością na arsenian w porównaniu do komórek typu dzikiego [67]. Białko Acr2p zostało oczyszczone oraz zmierzono jego aktywność reduktazową [67]. Samo białko Acr2p redukowało niewielkie ilości arsenianu. Dopiero połączenie cytosolu komórek drożdży i oczyszczonego białka Acr2p spowodowało pojawienie się wysokiej aktywności reduktazowej. Redukcja arsenianu przez Acr2p nie była zwiększona przez dodanie takich reduktantów jak NADPH i GSH. Tak więc zgodnie z hipotezą Acr2p jest reduktazą arsenianową, ale do swej aktywności wymaga innych, nieznanych kofaktorów obecnych w cytosolu. Nie wykluczono również istnienia innego białka o właściwości reduktazowej, które tworzyłoby funkcjonalny kompleks z Acr2p [67].

Zjawisko oporności komórek drożdży na sole arsenu determinowane jest przez wiele genów, w tym również przez gen *ACR1*, zlokalizowany na chromosomie XVI w sprzężeniu z genami *ACR2* i *ACR3* (Ryc. 3). Hipotetyczne białko Acr1 wykazuje podobieństwo do siedmiu czynników transkrypcyjnych, w tym Yap1 i Yap2, które tworzą specyficzną rodzinę drożdżowych białek bZIP [68]. Nadekspresja genu *ACR1* nie zwiększała fenotypu oporności na sole arsenu, ale uzyskanie maksymalnego poziomu oporności wymagało obecności genu *ACR1* na plazmidzie wielokopijnym razem z genami *ACR2* i *ACR3* [63].

Inaktywacja genu *ACR1* była przyczyną fenotypu nadwrażliwości na arsenin i arsenian [63]. Ponadto nadekspresja genu *ACR3* w komórkach mutanta *acr1* nie powodowała fenotypu bardzo wysokiego poziomu oporności na sole arsenu, tak jak to miało miejsce w komórkach typu dzikiego [63]. W przypadku mutanta *acr1* nie obserwowano wpływu radioaktywnej formy arsenu na zewnątrz komórki. Na podstawie powyższych wyników wysunięto hipotezę, że Acr1p jest pozytywnym regulatorem transkrypcji genu *ACR3* (Ryc. 3) [63]. Ostatnio wykazano, że ekspresja fuzji promotorów genów *ACR2* i *ACR3* z genem reporterowym *lacZ* jest indukowana przez arsenin, arsenian, winian antymonylo-potasowy oraz wymaga produktu genu *ACR1* (Ryc. 3) [69].

Na podstawie dostępnych danych uzyskanych na temat zjawiska oporności komórek drożdży *Saccharomyces cerevisiae* na sole arsenu można zaproponować następujący mechanizm detoksyfikacji arsenu w komórce (Ryc. 4). Arsenian wnika do wnętrza ko-



Ryc. 4. Mechanizm oporności komórki drożdżowej na sole arsenu.

mórki za pośrednictwem transporterów fosforanowych [61]. Droga wnikania arseninu jest nieznana, ale przypuszczalnie arsenin w formie nie zjonizowanej przechodzi pasywnie przez błonę komórkową albo jest transportowany przez białka błonowe odpowiedzialne za transport nie zjonizowanych związków organicznych [70]. Następnie arsenian redukowany jest do arseninu przy udziale Acr2p [63, 67]. Następnie arsenin w formie wolnego oksoanionu

usuwany jest na zewnątrz komórki przez transporter Acr3p [64]. Arsenin może też ulegać koniugacji z glutationem (GSH), a powstałe koniugaty As(GS)₃ usuwane są z cytosolu do wakuoli za pośrednictwem ABC transportera Ycf1p [65].

Dokładne poznanie mechanizmu obrony komórek drożdży przed toksycznym działaniem soli arsenu, włącznie ze sposobami wywołania fenotypu nadwrażliwości komórek na arsen, umożliwi w przyszłości ich wykorzystanie jako organizmu modelowego w poszukiwaniu genów oporności na arsen w genomie komórek pierwotniaków chorobotwórczych i ludzkich komórek nowotworowych. Zrealizowanie tych celów będzie miało szczególne znaczenie praktyczne w medycynie molekularnej.

IV-3. Zjawisko oporności pasożytniczych pierwotniaków na związki arsenu i antymonu

Aromatyczne związki arsenu oraz leki zawierające pokrewny metal antymon są ciągle głównymi środkami leczniczymi w zakażeniach pierwotniakami z rodzaju *Trypanosoma* i *Leishmania*. Arsenowe pochodne melaminy (melarsoprol), pochodne diamidyny (pentamidyna) oraz kilka innych leków stosuje się w leczeniu śpiączki afrykańskiej, powodowanej przez *Trypanosoma brucei*. Jedynie melarsoprol działa skutecznie w późnym okresie choroby [71]. Oporność na melarsoprol i inne leki zawierające arsen została zaobserwowana zarówno w szczepach laboratoryjnych *Trypanosoma*, jak również w szczepach izolowanych od chorych [71]. Świdrowce odporne na melarsoprol wykazują krzyżową oporność na diamidynę, a także akumulują mniej diamidyny [72]. Ostatnia obserwacja może wskazywać na obecność wspólnego systemu transportu komórkowego arsenopochodnych melaminy i diamidyn. Carter i Fairlamb [73] szukali potencjalnych substratów dla tego transportera, konkurujących z tlenkiem melarsenu. Okazało się, że arsenopochodne melaminy są transportowane do wnętrza komórki przez transporter adenozyliny typu P2. U szczepów świdrowców opornych na związki arsenu nie stwierdzono występowania tego transportera, co sugeruje, że oporność na melaninowe pochodne arsenu wynika z zablokowania drogi ich wnikania do komórki pierwotniaka [73].

Leishmania występuje powszechnie na całym świecie i powoduje 400 000 nowych zakażeń u ludzi każdego roku [74]. Wszystkie formy leishmaniozy leczą się przy pomocy leków zawierających pięciowartościowy antymon: Pentostam (styboglukonian sodu) i Glucantime (antymonian *N*-metylo- glukami-

ny) [75]. Niestety u wielu pacjentów terapia antymonowa jest nieskuteczna i u takich chorych występują szczepy pierwotniaków odporne na związki antymonu [76]. Opisano szczepy *Leishmania* odporne nie tylko na antymon pięciowartościowy, ale także na antymon trójwartościowy i arsenin [77].

Amplifikacja dużych fragmentów genomu jest często obserwowanym zjawiskiem w szczepach opornych na arsenin [78]. Pierwszym zidentyfikowanym amplifikowanym genem był *pgpA* kodujący białko należące do rodziny ABC transporterów. Białko to wykazuje znaczne podobieństwo do białka towarzyszącego zjawisku wielolekowej oporności typu MRP [79]. Późniejsze badania wykazały, że nadekspresja genu *pgpA* w komórkach *Leishmania tarentolae* i *Leishmania major* była przyczyną tylko niskiego poziomu oporności na arsenin [80]. Konsekwentnie, inaktywacja genu *pgpA* u *Leishmania tarentolae* nie powodowała wzrostu wrażliwości na arsenin [81]. Gen *pgpA* jest często amplifikowany łącznie z genem *GSH1* w komórkach arseno-opornych [82]. Ten ostatni koduje syntetazę γ -glutamylcysteinową biorącą udział w syntezie GSH, co może sugerować, że PgpA rozpoznaje S-koniugaty glutationu jako substraty [82]. Na podstawie powyższych wyników wysunięto hipotezę, że PgpA transportuje do wewnątrzkomórkowych przedziałów koniugaty arsenu z glutationem [83].

De y i wsp. [83] zaobserwowali, że wysoki poziom oporności na arsenin u *Leishmania tarentolae* zależny był od aktywnego wpływu toksycznych oksoanionów na zewnątrz komórki. Mechanizm ten nie miał związku z białkiem PgpA. Substratem dla nowo odkrytego systemu transportu może być arsen połączony poprzez grupy tiolowe z GSH lub z trypanotieniem [84]. Należy podkreślić, że szczepy *Leishmania* odporne na arsenin charakteryzują się ponad 40-krotnym wzrostem ilości trypanotienia w komórce [84]. Powyższe dane pozwoliły na opracowanie modelu mechanizmu oporności komórek *Leishmania* na leki zawierające pięciowartościowe atomy arsenu lub antymonu. Model ten obejmowałby co najmniej trzy etapy: (1) redukcję As (V) / Sb (V) do As (III) / Sb (III), (2) koniugację As (III) / Sb (III) z trypanotieniem oraz (3) transport S-koniugatów arsenu i antymonu na zewnątrz komórki za pośrednictwem ATP-zależnej pompy [84]. Formowanie się S-koniugatów raczej, niż zwiększenie ilości cząsteczek pompy w błonie komórkowej, byłoby krytycznym etapem tego modelu, bezpośrednio warunkującym poziom oporności. Jak na razie nie zidentyfikowano białek reduktazy i ATP-zależnej pompy arsenowej warunkujących ten proces.

IV-4. Terapia arsenikowa w białaczce promielocytowej a oporność komórek ssaków na związki arsenu

Linie komórkowe ssaków odporne na arsenin zostały wyselekcjonowane w wielu laboratoriach [85]. Nowotworowe linie komórkowe jajnika, uzyskane ze względu na oporność na *cis*-platynę, charakteryzowały się również krzyżową opornością na arsenin i winian antymonylo-potasowy [4] lub na melfalan, chlorambucyl, arsenin i kadm w przypadku komórek białaczki [5]. Oporność komórek chomika na arsenin była warunkowana zależnym od energii usuwaniem jonów arsenu z komórki [85]. Inhibitory enzymu S-transferazy glutationowej zmniejszały wpływ arseninu, co sugerowało usuwanie As(GS)₃ [85]. Jednak szczegółowa analiza produktów wpływu nie potwierdziła obecności As(GS)₃. Wang i wsp. [85] uważają, że arsenian jest redukowany do arseninu, który jest jedyną formą arsenu usuwaną z komórki. Komórki jajnika chomika SA7 odporne na arsenin wykazują wpływ arseninu, który jest hamowany przez czynniki redukujące poziom GSH, np. przez dinitrofluorobenzen, a także przez werapamil i cyklosporynę A [86]. Możliwe, że arsenin po koniugacji z glutationem usuwany jest z komórki przez odpowiednią pompę. Ostatnio opisano kilka przykładów transporterów S-koniugatów glutationu. Jednym z nich jest białko towarzyszące wielolekowej oporności typu MRP1 [87], transportujące na zewnątrz komórki S-koniugaty glutationu [88]. Nadekspresja genu *MRP1* zwiększa oporność komórek nie tylko na cytostatyki, ale także na arsenin, arsenian oraz na trój- i pięciowartościowe związki antymonu [89]. Wykazano również, że arsenin stymuluje wpływ S-koniugatów glutationu za pośrednictwem MRP1 [90]. Delecja genu kodującego białko MRP1 w komórkach embrionalnych było przyczyną wzrostu wrażliwości na arsenin sodowy, etopozyd i inne cytostatyki [91]. Ponadto udało się wyhodować myszy transgeniczne, których genom komórek wszystkich tkanek miał zniszczone obie kopie genu *MRP1* [92]. Takie komórki mysie wykazywały zwiększoną nadwrażliwość na etopozyd, ale wrażliwość na arsenin sodowy była taka sama jak w komórkach typu dzikiego [92]. Aktualnie nie udało się wykazać w badaniach *in vitro* i *in vivo*, że MRP1 rzeczywiście bezpośrednio bierze udział w transporcie As(GS)₃. Pomimo tego wydaje się, że MRP1 może transportować obok cytostatyków także As(GS)₃. Nie można wykluczyć jednak istnienia jeszcze innego, nieznanego dotychczas i niezależnego systemu transportu okso-

anionów arsenu, warunkującego wysoki poziom oporności komórek ssaków.

Ostatnio zastosowano z powodzeniem trójtlenek arsenu do leczenia nawrotów ostrej formy białaczki promielocytowej [93]. Podawanie niskich dawek arsenu przez 12-39 dni spowodowało całkowitą remisję nowotworu u 11-stu na 12 leczonych pacjentów. Terapia arsenikowa miała bardzo łagodne skutki uboczne, takie jak wysypka, lekki ból głowy, uczucie zmęczenia. Efekt leczniczy arsenu polegał na eliminacji komórek nowotworowych ze szpiku kostnego poprzez indukcję w nich apoptozy. U trzech z 11-stu pacjentów zaobserwowano jednak nawrót choroby po terapii arsenikowej, co sugeruje istnienie mechanizmów oporności na sole arsenu również w komórkach ludzkich. Wyjaśnienie powyższego zagadnienia, tak ważnego z medycznego punktu widzenia, może mieć duże znaczenie praktyczne w przyszłości.

Artykuł otrzymano 10 maja 1999 r.

Zaakceptowano do druku 26 lipca 1999 r.

Piśmiennictwo

1. Ehrlich P (1960) Collected Papers of Paul Ehrlich. Pergamon Press, London, str. 183-194
2. Berman JD (1988) *J Infect Dis* **10**: 560-586
3. Borst P, Ouellette M (1995) *Ann Rev Microbiol* **49**: 427-460
4. Naredi P, Heath DD, Enns RE, Howell SB (1995) *J Clin Invest* **95**: 1193-1198
5. Ishikawa T, Bao JJ, Yamane Y, Akimaru K, Friedrich K, Wright CD, Kuo MT (1996) *J Biol Chem* **271**: 14981-14988
6. Loehr TM, Plane RA (1968) *Inorg Chem* **7**: 1708-1714
7. Townson, JK (1997) W: Hayes JD, Wolf CR (red) *Molecular Genetics of Drug Resistance*. Harwood Academic Publishers, The Netherlands, str. 139-174
8. Lee TC, Oshimura M, Barrett JC (1985) *Carcinogenesis* **6**: 1421-1426
9. Knowles FC, Benson AA (1983) *Trends Biochem Sci* **8**: 178-180
10. Bennett RL, Malamy MH (1970) *Biochem Biophys Res Commun* **40**: 496-503
11. Kenney LJ, Kaplan JH (1988) *J Biol Chem* **263**: 7954-7960
12. Caltabiano MM, Koestler TP, Poste G, Greig RG (1986) *J Biol Chem* **261**: 13382-13386
13. Chang EC, Kosman DJ, Willsky GR (1989) *J Bacteriol* **171**: 6349-6352
14. Chin KV, Tanaka G, Darlington G, Pastan I, Gottesman MM (1990) *J Biol Chem* **265**: 221-226
15. Szinicz L, Forth W (1988) *Arch Toxicol* **61**: 444-476
16. Chen YC, Liu-Shiau SY, Lin JK (1998) *J Cell Physiol* **177**: 324-333
17. Styblo M, Serves SV, Cullen WR, Thomas DJ (1997) *Chem Res Toxicol* **10**: 27-33
18. Cavigelli M, Li WW, Lin A, Su B, Yoshioka K, Karin M (1996) *EMBO J* **15**: 6269-6279
19. Lee TC, Tanacka N, Lamb PW, Gilmer TM, Barrett JC (1988) *Science* **241**: 79-81
20. Oya-Ohta Y, Kaise T, Ochi T (1996) *Mutat Res* **357**: 123-129

21. Kochhar TS, Howard W, Hoffman S, Brammer-Carleton L (1996) *Toxicol Lett* **84**: 37-42
22. Huang RN, Ho IC, Yih LH, Lee TC (1995) *Environ Mol Mutagen* **25**: 188-196
23. Radha S, Natarajan AT (1998) *Mutagenesis* **13**: 229-234
24. Silver S, Budd K, Leahy KM, Shaw WV, Hammond D, Novick R, Willisky GR, Malamy M, Rosenberg H (1981) *J Bacteriol* **146**: 983-996
25. Novick RP, Roth C (1968) *J Bacteriol* **95**: 1335-1342
26. Hedges RW, Baumberg S (1973) *J Bacteriol* **115**: 459-460
27. Mobley HLT, Rosen BP (1982) *Proc Natl Acad Sci USA* **79**: 6119-6122
28. Silver S, Keach D (1982) *Proc Natl Acad Sci USA* **79**: 6114-6118
29. Chen CM, Misra TK, Silver S, Rosen BP (1986) *J Biol Chem* **261**: 15030-15038
30. Sofia HJ, Burland V, Daniels DL, Plunkett III G, Blattner FR (1994) *Nucl Acids Res* **22**: 2576-2586
31. Carlin A, Shi W, Dey S, Rosen BP (1995) *J Bacteriol* **177**: 981-986
32. Ji G, Silver S (1992) *J Bacteriol* **174**: 3684-3694
33. Rosenstein R, Peschel A, Wieland B, Götz F (1992) *J Bacteriol* **174**: 3676-3683
34. Takemaru K, Mizuno M, Sato T, Takeuchi M, Kobayashi Y (1995) *Microbiology* **141**: 323-327
35. Sato T, Kobayashi Y (1998) *J Bacteriol* **180**: 1655-1661
36. Neyt C, Iriarte M, Thi VII, Cornelis GR (1997) *J Bacteriol* **179**: 612-619
37. San Francisco MJD, Hope CL, Owolabi JB, Tisa LS, Rosen BP (1990) *Nucl Acids Res* **18**: 619-624
38. Wu J, Rosen BP (1991) *Mol Microbiol* **5**: 1331-1336
39. Wu J, Rosen BP (1993) *Mol Microbiol* **8**: 615-623
40. Wu J, Rosen BP (1993) *J Biol Chem* **268**: 52-58
41. Chen Y, Rosen BP (1997) *J Biol Chem* **272**: 14257-14262
42. Walker JE, Saraste M, Runswick MJ, Gay NJ (1982) *EMBO J* **1**: 945-951
43. Rosen BP, Weigel U, Karkaria C, Gangola P (1988) *J Biol Chem* **263**: 3067-3070
44. Karkaria CE, Chen CM, Rosen BP (1990) *J Biol Chem* **265**: 7832-7836
45. Hsu CM, Kaur P, Karkaria CE, Steiner RF, Rosen BP (1991) *J Biol Chem* **266**: 2327-2332
46. Wu J, Tisa LS, Rosen BP (1992) *J Biol Chem* **267**: 12570-12576
47. San Francisco MJ, Tisa LS, Rosen BP (1989) *Mol Microbiol* **3**: 15-21
48. Tisa LS, Rosen BP (1990) *J Biol Chem* **265**: 190-194
49. Dey S, Dou D, Rosen BP (1994) *J Biol Chem* **269**: 25442-25446
50. Rosen BP, Borbolla MG (1984) *Biochem Biophys Res Commun* **124**: 760-765
51. Broer S, Ji G, Broer A, Silver S (1993) *J Bacteriol* **175**: 3480-3485
52. Kuroda M, Dey S, Sanders OI, Rosen BP (1997) *J Biol Chem* **272**: 326-331
53. Rosen BP, Weigel U, Monticello RA, Edwards BP (1991) *Arch Biochem Biophys* **284**: 381-385
54. Ji G, Silver S (1992) *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 9474-9478
55. Ji G, Garber EA, Arnes LG, Chen CM, Fuchs JA, Silver S (1994) *Biochemistry* **33**: 7294-7299
56. Oden KL, Gladysheva TB, Rosen BP (1994) *Mol Microbiol* **12**: 301-306
57. Gladysheva TB, Oden KL, Rosen BP (1994) *Biochemistry* **33**: 7288-7293
58. Liu J, Gladysheva TB, Lee L, Rosen BP (1995) *Biochemistry* **34**: 13472-13476
59. Rytka J, Palamarczyk G (1993) *Post Biochem* **39**: 152-155
60. Ulaszewski S (1994) *Biotechnologia* **1**: 17-31
61. Bun-ya M, Shikata S, Nakade S, Yompakdee C, Harashima S, Oshima Y (1996) *Curr Genet* **29**: 344-351
62. Yompakdee C, Bun-ya M, Shikata K, Ogawa N, Harashima S, Oshima Y (1996) *Gene* **171**: 41-47
63. Bobrowicz P, Wysocki R, Owsianik G, Goffeau A, Ulaszewski S (1997) *Yeast* **13**: 819-828
64. Wysocki R, Bobrowicz P, Ulaszewski S (1997) *J Biol Chem* **272**: 30061-30066
65. Ghosh M, Shen J, Rosen BP (1999) *Proc Natl Acad Sci USA*, w druku
66. Szczypka M, Wemmie J, Moye-Rowley WS, Thiele DJ (1994) *J Biol Chem* **269**: 22853-22857
67. Mukhopadhyay R, Rosen BP (1998) *FEMS Microbiol Lett* **168**: 127-136
68. Fernandes L, Rodrigues-Pousada C, Struhl K (1997) *Mol Cell Biol* **17**: 6982-6993
69. Bobrowicz P, Ulaszewski S (1998) *Cell Mol Biol Lett* **3**: 13-20
70. Cervantes C, Ji G, Ramirez JL, Silver S (1994) *FEMS Microbiol Rev* **15**: 355-367
71. Bacchi CJ (1993) *Parasitol Today* **9**: 190-193
72. Frommel TO, Balber AE (1987) *Mol Biochem Parasitol* **26**: 183-192
73. Carter NS, Fairlamb AH (1993) *Nature* **361**: 173-175
74. Ashford RW, Desjeux P, DeRaadt P (1992) *Parasitol Today* **8**: 104-105
75. Olliaro PL, Bryceson ADM (1993) *Parasitol Today* **9**: 323-328
76. Jackson JE, Tally JD, Ellis WY, Mebrahtu YB (1990) *Am J Trop Med Hyg* **43**: 464-480
77. Ouellette M, Papadopoulou B, Haimeur A, Grondin K, Leblanc E i wsp. (1995) W: Georgopapadakou NH (red) *Drug Transport in Antimicrobial and Anticancer Chemotherapy*. New York: Dekker, str. 377-402
78. Detke S, Katakura K, Chang KP (1989) *Exp Cell Res* **180**: 161-170
79. Ouellette M, Fase-Fowler F, Borst P (1990) *EMBO J* **9**: 1027-1033
80. Papadopoulou B, Roy G, Dey S, Rosen BP, Ouellette M (1994) *J Biol Chem* **269**: 11980-11986
81. Papadopoulou B, Roy G, Dey S, Rosen BP, Olivier M, Ouellette M (1996) *Biochem Biophys Res Commun* **224**: 772-778
82. Grondin K, Haimeur A, Mukhopadhyay R, Rosen BP, Ouellette M (1997) *EMBO J* **16**: 3057-3065
83. Dey S, Papadopoulou B, Haimeur A, Roy G, Grondin K, Dou D, Rosen BP (1994) *Mol Biochem Parasitol* **67**: 49-57
84. Mukhopadhyay R, Dey S, Xu N, Gage D, Lightbody J, Ouellette M, Rosen BP (1996) *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 10383-10387
85. Wang ZL, Dey S, Rosen BP, Rossman TG (1996) *Toxicol Appl Pharmacol* **137**: 112-119
86. Huang RN, Lee TC (1996) *Toxicol Appl Pharmacol* **141**: 17-22
87. Cole SPC, Bhardwaj G, Gerlach JH, Mackeie JE, Grant CE, Almquist KC, Stewart AJ, Kurz EU, Duncan AMV, Deeley RG (1992) *Science* **258**: 1650-1654
88. Zaman GJR, Flens MJ, Van Leusden MR, De Haas M, Mulder HS, Lankelma J, Pinedo HM, Scheper RJ, Baas F, Broxterman HJ, Borst P (1994) *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 8822-8826
89. Cole SPC, Sparks KE, Fraser K, Loe DW, Grant CE, Wilson GM, Deeley RG (1994) *Cancer Res* **54**: 5902-5910
90. Zaman GJR, Lankelma J, van Tellingen O, Beijnen J, Dekker H, Paulusma C, Oude Elferink RPJ, Baas F, Borst P (1995) *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 7690-7694
91. Lorico A, Rappa G, Flavell RA, Sartorelli AC (1996) *Cancer Res* **56**: 5351-5355
92. Lorico A, Rappa G, Finch RA, Yang D, Flavell RA, Sartorelli AC (1997) *Cancer Res* **57**: 5238-5242
93. Soignet SL, Maslak P, Wang ZG, Jhanwar S, Calleja E, Dardashti LJ, Corso D, DeBlasio A, Gabrilove J, Scheinberg DA, Pandolfi PP, Warrel RP Jr (1998) *N Engl J Med* **339**: 1341-1348

Mutagenność i kancerogenność aflatoksyny AFB₁

Mutagenicity and carcinogenicity of aflatoxin AFB₁

JOLANTA PIERZYNOWSKA¹, ELŻBIETA GRZESIUK²

Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Metabolizm wtórny u *Aspergillus*
- III. Biotransformacja aflatoksyny AFB₁
- IV. Rola genu *p53* w kancerogenezie wywołanej AFB₁
- V. Antymutageny przeciwdziałające mutagennemu działaniu AFB₁
- VI. Podsumowanie

I. Wstęp

Mikotoksyny stanowią grupę ponad 300 różnych związków chemicznych, które pod postacią metabolitów wtórnych są wytwarzane przez grzyby pleśniowe [1]. Ponieważ grzyby charakteryzują się zdolnością przeżywania w bardzo trudnych warunkach, np. w środowisku o niskiej wilgotności to nieomal cała żywność jest narażona na skażenie mikotoksynami. Ocenia się, że około 25% produktów spożywczych świata takich jak mąka, przetwory mleczne, jaja, mięso jest zakażone grzybami wytwarzającymi toksyny [2]. Jeśli chodzi o zboża to mogą one być skażone zarówno w okresie zbiorów jak i podczas przechowywania.

Odkrycie związku pomiędzy skażeniem żywności pleśniami wytwarzającymi toksyny a chorobami (często śmiertelnymi) występującymi u zwierząt wyższych i ludzi nie było proste. Dopiero dwa epizody zwróciły uwagę naukowców i producentów żywności na problem sposobu przechowywania żywności i możliwość jej skażenia mikotoksynami. Pierwszy miał miejsce w Rosji w latach 1942-1947 i dotyczył wypadków śmiertelnych po spożyciu żywności skażonej grzybami z rodzaju *Fusarium* [3]. Drugi zdarzył się w Anglii w latach 60-tych. Wówczas to setki

Contents:

- I. Introduction
- II. Dispensable metabolic pathways in *Aspergillus*
- III. The biotransformation of aflatoxin AFB₁
- IV. The role of *p53* gene in AFB₁ carcinogenesis
- V. Antimutagens acting against AFB₁
- VI. Conclusion

tysięcy indyków padło po zjedzeniu sprowadzonej z Brazylii paszy, która, jak wykazała analiza mikrobiologiczna, była skażona *Aspergillus flavus*. Gatunek ten oraz dwa inne: *A. parasiticus* i *A. nomius* wytwarzają aflatoksynę, która przez IARC (*International Agency for Research on Cancer*) została zaliczona do klasy I ludzkich karcinogenów i znalazła się na liście dziesięciu najsilniejszych znanych toksyn świata. Liczne "epidemie" ludzkich ostrych aflatoksykoz występują głównie w południowo-wschodniej Azji i Afryce w rejonach charakteryzujących się wysokim endemicznym stężeniem aflatoksyn w tradycyjnym pożywieniu, takim jak ryż, kukurydza, soja, a także mleko i mięso, a szczególnie jego przetwory np. kiełbasa typu Salami [4]. Epidemie te objawiają się występowaniem nowotworów wątroby i krwawieniem z przewodu pokarmowego. Nowotwory wątroby wywołane spożywaniem skażonej aflatoksyną żywności mają związek ze specyficzną mutacją w genie *p53*, którego produkt jest najlepiej poznany antyonkogenem.

II. Metabolizm wtórny u *Aspergillus*

Aflatoksyny są interesującym przykładem czynników uszkodzających DNA zwierząt wyższych, będących jednocześnie produktami naturalnego metabolizmu u grzybów. Szlaki metaboliczne, których produktami są toksyny, nie są niezbędne do życia i wzrostu grzybów. Funkcjonują one tylko w określonych, szczególnych warunkach, niewystarczających do optymalnego wzrostu grzyba; dlatego też są one określane jako szlaki metabolizmu wtórnego. Zwy-

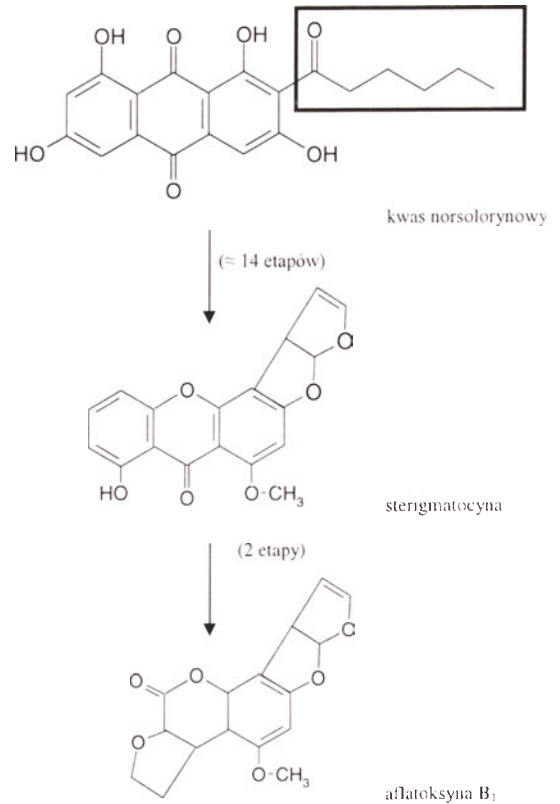
¹Lek. wet., Zakład Oceny Żywności, Katedra Żywności Człowieka SGGW, ul. Nowoursynowska 166, 02-787 Warszawa;

²dr hab., Zakład Biologii Molekularnej, Instytut Biochemii i Biofizyki PAN, ul. Pawińskiego 5A, 02-106 Warszawa

kle nie są one wyrażane w sposób konstytutywny, lecz są indukowane w odpowiedzi na brak pożywienia lub pojawienie się organizmów kompetycyjnych. Indukcja szlaku metabolizmu wtórnego, który wykorzystuje alternatywne źródła pożywienia, zwiększa szansę na przeżycie pleśni w suboptymalnych warunkach.

Niezmiernie ciekawe jest usytuowanie genów, których produkty biorą udział w metabolizmie wtórnym. Okazało się, że u grzybów występują zgrupowania genów (ang. *cluster*) pozostające pod wspólną kontrolą genów regulatorowych. Taki model funkcjonowania genomu jest powszechny u Prokaryota, natomiast odkrycie występowania grup funkcjonalnie spokrewnionych genów również u grzybów filamentujących było sporym zaskoczeniem [5]. Zgrupowanie genów może być zdefiniowane jako ścisły związek dwóch lub więcej genów, których produkty uczestniczą we wspólnym szlaku metabolicznym lub rozwojowym. Grzyby posiadają liczne wtórne szlaki metaboliczne, z których najważniejsze to szlaki kataboliczne, funkcjonujące w celu wykorzystania jako pożywienia niskocząsteczkowych składników podłoża, takich jak prolina czy chinian oraz szlaki biosyntezy niskocząsteczkowych związków, antybiotyków i mikotoksyn, które przypuszczalnie pełnią funkcję ochronną [6].

Dwie spośród mikotoksyn, aflatoksyna B₁ i sterigmatocystyna pochodzą z tego samego szlaku metabolizmu wtórnego [7, 8], przy czym sterigmatocystyna jest substratem dla aflatoksyny B₁, produktu końcowego tego szlaku. Aflatoksyna wytwarzana jest tylko przez kilka gatunków z rodzaju *Aspergillus* podczas gdy sterigmatocystynę wytwarza co najmniej 20 gatunków grzybów. Pierwszym produktem pośrednim szlaku mikotoksyn poliketydynowych, sterigmatocystyny i aflatoksyny (S/AF), jest część alifatyczna kwasu norsolorynowego (Ryc. 1). Aby doszło do syntezy tego produktu pośredniego, wymagana jest nie tylko syntaza poliketydynowa (PKS), lecz jak się okazało, również enzymy połączone w jeden łańcuch polipeptydowy zwany syntazą kwasów tłuszczowych – FAS (*Fatty Acid Synthase*) [8-10]. FAS zbudowany z podjednostki α i β prawdopodobnie katalizuje reakcję, której produktem jest sześciowęglowy kwas tłuszczowy służący

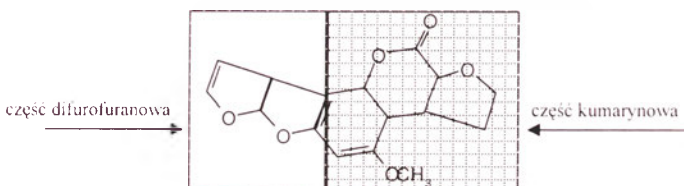


Ryc. 1. Szlak metaboliczny sterigmatocystyny i aflatoksyny AFB₁ (SF/AFB₁). Alifatyczny fragment kwasu norsolorynowego, który jest pierwszym produktem przejściowym tego szlaku, jest otoczony ramką.

jako starter dla PKS. Oprócz wspomnianych już syntaz w szlaku metabolicznym S/AF bierze również udział 5 monooksygenaz, kilka reduktaz, dehydrogenaz, metylotransferaza i esteraza [8]. W zależności od pH podłoża uruchomiony zostaje albo szlak S/AF albo ten, który prowadzi do produkcji penicyliny, przy czym kwaśne pH faworyzuje produkcję mikotoksyn [11], a pH zasadowe wytwarzanie penicyliny [12, 13].

III. Biotransformacja aflatoksyny AFB₁

Cząsteczka aflatoksyny B₁ (AFB₁) zbudowana jest z systemu pierścieni furofuranowych połączonych z częścią kumaryny, która posiada grupę metoksyłową przyłączoną do pierścienia benzenowego (Ryc. 2). W warunkach naturalnych występują 4 aflatoksyny: B₁, B₂, G₁ i G₂, przy czym najsilniejszym kancerogenem jest aflatoksyna B₁ a najsłabszym G₂.



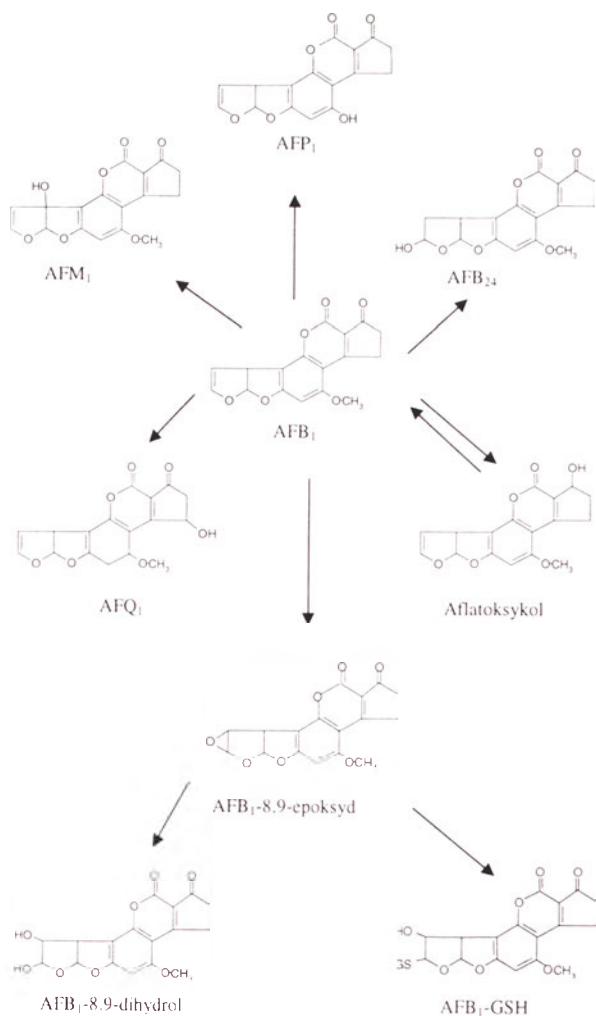
Ryc. 2. Struktura chemiczna AFB₁.

Mutagenność i kancerogenność AFB₁ jest związana z metaboliczną bioaktywacją jej cząsteczki. Wykazano, że w nieobecności systemu bioaktywnego aflatoksyna B₁ nie wykazuje właściwości mutagennych, ani nie wiąże się kowalencyjnie z takimi makromolekułami jak DNA. Ponieważ bioaktywacja AFB₁ jest wymagana do zapoczątkowania kancerogenezy to wiele uwagi poświęcono biotransformacji tej naturalnie występującej mikotoksyny. Początkowy metabolizm AFB₁ może obejmować 4 typy reakcji: O-dealkilację, hydroksylację, epoksydację oraz ketoredukcję. Główne kierunki biotransformacji AFB₁ przedstawia rysunek 4. Jedyne katalizowana przez reduktazę zależną od NADPH redukcja AFB₁ do aflatoksykolu jest odwracalna. Pozostałe metabolity: AFM₁, AFQ₁, AFP₁ i AFB₂ uznaje się za produkty detoksyfikacji, których powstanie wymaga systemu cytochromów P450 (Ryc. 3). Mutagenność i kancerogenność AFB₁ wynika przede wszystkim z powstawania AFB₁-8,9-epoksydu, formy, która reaguje bezpośrednio z DNA. Wiązanie z DNA jest tak gwałtowne, że epoksyd nigdy nie został wyizolowany w warunkach *in vivo*, natomiast wykrycie trwałego adduktu 8,9-dihydro-8-(N7-guanyli)-9-

hydroksy AFB₁ (AFB₁-guanina), który powstaje w obecności systemów aktywnych nie następuje trudno [14-16]. Niezależnie od badanego gatunku zwierzęcego czy rodzaju tkanki aktywacja AFB₁ do 8,9-epoksydu jest absolutnie niezbędna aby aflatoksyna wiązała się z DNA i wykazywała działanie kancerogenne i mutagenne.

Oksydacyjna biotransformacja AFB₁ zachodzi przy udziale cytochromu P450, który stanowi superrodzinę polisubstratowych monooksygenaz (CYP) zawierających hem, zdolnych do utleniania i redukcji całej gamy substratów zarówno endogennego jak i egzogennego pochodzenia. Wniosek, iż cytochrom P450 bierze udział w biotransformacji AFB₁ wysnu- to na podstawie następujących obserwacji:

- (i) w układzie *in vitro* metabolizm mikotoksyn wymaga tlenu cząsteczkowego i NADPH,
- (ii) inhibitory i induktory cytochromu P450 mają wpływ na wrażliwość zwierząt na kancerogenezę indukowaną przez AFB₁,
- (iii) AFB₁ ulega aktywacji w systemach, które zawierają oczyszczony cytochrom P450, reduktazę NADPH cytochromu P450, NADPH i fosfolipid,



Ryc. 3. Biotransformacja AFB₁ (opis w tekście). G-S oznacza resztę glutationu.

(iv) przeciwciała przeciwko izoformom cytochromu P450 hamują aktywację AFB₁ katalizowaną przez mikrosomy lub oczyszczony cytochrom P450, i wreszcie

(v) systemy, w których różne izoformy cytochromu P450 są syntetyzowane z cDNA wykazują właściwość aktywacji AFB₁ [17-22].

Wykazano, że szereg form cytochromu P450 jest zaangażowanych w bioaktywację AFB₁. Tabela I zawiera główne klasy cytochromu P450 i ich charakte-

ściach mutagennych [21]. W badaniach *in vitro* stwierdzono, że głównymi katalizatorami epoksydacji AFB₁ w wątrobie ludzkiej są CYP1A2 i CYP3A4 [34]. Wynikiem biotransformacji mikrosomalnej AFB₁ u ludzi są również dwa metabolity rozpuszczalne w wodzie AFQ₁ i AFM₁, których powstanie jest katalizowane odpowiednio, przez CYP3A4 i CYP1A2, a których właściwości kancerogenne są tylko niewielką częścią potencjału jaki reprezentuje forma epoksydowa AFB₁ [34, 36]. W porównaniu do

Tabela I

Formy cytochromów P450 biorące udział w biotransformacji aflatoksyny AFB₁ (opis w tekście)

Podrodzina P540	Induktor	Specyficzna izoforma	Metabolity AFB ₁
CYP1A	PAH*	1A1, 1A2	AFB ₁ -8,9-epoksyd, AFM ₁
CYP2B	fenobarbital	2B1, 2B7	AFB ₁ -8,9-epoksyd
CYP2C	fenobarbital	2C1, 2C2	AFB ₁ -8,9-epoksyd
CYP3A	glukokortykoidy	3A3, 3A4	AFB ₁ -8,9-epoksyd, AFQ ₁

rystykę. U zwierząt formy cytochromu P450 zdolne do aktywacji AFB₁ należą do podrodzin 1A, 2B, 2C i 3A [23-26]. Porównując działanie różnych induktorów cytochromu P450 ustalono, które klasy cytochromu biorą udział w aktywacji AFB₁ u poszczególnych gatunków zwierząt. Stwierdzono, że traktowanie gryzoni klasycznym induktorem cytochromu P450 fenobarbitalem prowadziło do znacznego podwyższenia zdolności mikrosomów wątrobowych do wytworzenia adduktów AFB₁ w DNA [19, 27, 28]. Podobne wyniki uzyskano w badaniach *in vitro*, w których wykorzystano frakcję mikrosomalną izolowaną z komórek wątroby szczurów i myszy co pozwoliło wysnuć wniosek, że aktywacja AFB₁ jest katalizowana przez te izoformy cytochromu P450, które są indukowane fenobarbitalem [29]. Inne wyniki uzyskano w przypadku chomika, u którego wyższą aktywność wykazywały te formy cytochromu P450, które były aktywowane policyklicznymi aromatycznymi węglowodorami (PAH) np. CYP1A [30, 31]. Natomiast u królików i świnek morskich w aktywacji AFB₁ brały udział te same klasy cytochromu P450 co u myszy i szczurów [32, 33].

U człowieka biotransformacja AFB₁ jest procesem kompleksowym kontrolowanym przez kilka izoform cytochromu P450 różniących się kinetyką reakcji [21, 25, 34, 35]. Wymienia się co najmniej 5 klas cytochromu P450: CYP1A2 (indukowany przez PAH), CYP2A6, CYP2A3, CYP2B7 i CYP3A4 (dwa ostatnie indukowane przez glukokortykoidy) zdolnych do aktywacji AFB₁ do metabolitów o właściwo-

CYP3A4 działanie CYP1A2 prowadzi do wyższego stosunku aktywacji do detoksyfikacji, czyli epoksydu do AFM₁ [34]. W literaturze jest jednak pewna różnica zdań dotycząca stopnia udziału CYP1A2 i CYP3A4 w metabolizmie AFB₁ u człowieka, szczególnie przy niskim stężeniu aflatoksyny w pokarmie co jest przypadkiem najczęściej spotykanym [25, 34-37]. Najnowsze badania kinetyki oksydacji i wiązania do DNA wykazały, że główną rolę w aktywacji AFB₁ odgrywa CYP1A2 [38]. Z badań tych wynika, że jest mało prawdopodobne, iż CYP3A4 jest głównym aktywatorem AFB₁ w wątrobie. Z drugiej strony stwierdza się obecność AFQ₁ i AFM₁ w moczu ludzi eksponowanych na AFB₁ co świadczyłoby o udziale zarówno CYP3A4 jak i CYP1A2 w metabolizmie AFB₁ *in vivo*.

IV. Rola genu *p53* w karcinogenezie AFB₁

Gen *p53* jest najlepiej poznanym ludzkim genem supresorowym karcinogenezy. Mutacje powstające w tym antyonkogenicie są najczęstszą przyczyną zapoczątkowania transformacji nowotworowej [39, 40]. Białko *p53* odgrywa bardzo ważną rolę w takich istotnych dla życia komórki procesach jak: kontrola cyklu komórkowego, naprawa i synteza DNA, różnicowanie komórek, plastyczność genomowa i apoptoza [39, 41, 42]. Spektrum mutacji w genie *p53* w przebiegu nowotworzenia jest na tyle charakterystyczne, że może pomóc zidentyfikować kancerogen i zdefiniować molekularne i biochemiczne mechani-

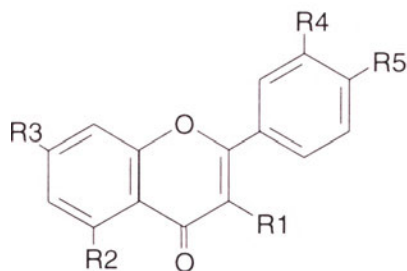
zmy odpowiedzialne za genetyczne uszkodzenia w DNA. AFB₁ preferencyjnie indukuje transwersję G do T w trzeciej pozycji kodonu 249 genu *p53* [43]. O wysokiej specyficzności tej reakcji świadczy analiza mutagennego działania innego kancerogenu, benzo[*a*]pyrenu, dla którego kodon 249 nie jest celem i w związku z tym nie wywołuje on raka wątroby lecz nowotwory płuc. Tak więc tworzenie adduktu AFB₁-DNA jest bezpośrednio związane ze specyficzną mutacją w genie supresorowym *p53*. Wynik ten jest zgodny ze spektrum mutacji stwierdzonym w próbkach pobranych od pacjentów, którzy zasiedlając regiony o wysokiej ekspozycji na AFB₁ (Azja, Afryka) zachorowali na raka wątroby [44, 45]. Związek pomiędzy występowaniem aflatoksyny AFB₁ a zapadalnością na raka wątroby pozwala (obok wirusa żółtaczk) uznać AFB₁ za główny czynnik etiologiczny tego typu nowotworu. Hs i e h [46] wyliczył, że w Stanach Zjednoczonych konsumpcja aflatoksyn AFB₁ w populacji ludzkiej wynosi 25.73 ng/kg wagi ciała. Wykorzystując dane uzyskane przez Calb org a [47] dla mieszkańców Azji i Afryki wyliczono, że ryzyko wystąpienia raka wątroby wynosi w tych częściach świata 10 przypadków śmiertelnych/100000 ludzi/1 ng AFB₁/kg wagi ciała/dzień. W USA notuje się 3.24 przypadków śmiertelnych/100000 mężczyzn/1 ng AFB₁/kg wagi ciała/dzień [48]. Taka śmiertelność odpowiada konsumpcji 10.6 ng/kg wagi ciała/dzień. Wynik ten sugeruje, że mężczyźni w USA są dwukrotnie bardziej odporni na kancerogenne działanie AFB₁ w porównaniu do mieszkańców Azji i Afryki.

V. Antymutageny przeciwdziałające mutagennej aktywności AFB₁

Związki chemiczne o działaniu mutagennym są powszechne. Naturalną konsekwencją ich występowania jest istnienie antymutagenów, które na drodze różnorodnych, często nie w pełni poznanych mechanizmów, zapobiegają działaniu mutagenów. Mogą one reagować bezpośrednio z reaktywnymi metabolitami mutagenów zapobiegając w ten sposób możliwości oddziaływania mutagenu z komórkowym DNA. Inny mechanizm działania antymutagenu polega na zmianie metabolizmu mutagenu poprzez hamowanie procesów aktywacji lub indukcję procesów detoksykacji albo też przez oba mechanizmy równocześnie. Antymutageny mogą też polegać na eliminacji premutagennych i mutagennych uszkodzeń DNA poprzez indukcję mechanizmów naprawy bezbłędnej i hamowanie mechanizmów naprawy pozostawiającej błędy w DNA [49, 50].

Jedną z najliczniejszych grup antymutagenów i antykancerogenów są flawonoidy. Znanych jest ponad 2000 związków flawonu różniących się stopniem utlenienia łącznika trójwęglowego -C-C-C-, stopniem hydroksylacji obu pierścieni aromatycznych, podstawnikami O-glikozydowymi grup hydroksylowych, występowaniem układów oligomerycznych (szczególnie w przypadku bioflawonoidów) [51]. W środowisku naturalnym flawonoidy występują w roślinach (liście, łodygi, kwiaty, owoce) w wakuolach komórkowych jako związki glikozydowe [52], a także jako wolne aglikony flawonoidowe [53]. Przeciętnie człowiek spożywa dziennie ok. 1 g flawonoidów [54] w tym ok. 50 mg kwercetyny [55]. Przykładami bioflawonoidów są: myricetyna, kwercetyna, kwercetyna i jej ponad 70 znanych O-glikozydów m.in. izokwercytryna, kwercymerytryna i rutyna, ponadto katechina, galangina itd. Podstawowym efektem przypisywanym flawonoidom jest obniżenie przepuszczalności i kruchości naczyń kapilarnych, działanie antyoksydacyjne i chelatujące jony metali, a w szczególności jony miedzi [56]. Spośród bioflawonoidów działających przeciwko AFB₁ wymienia się kaempfenol, glikozyd flawonowy rutynę [57], a także występujące w zielonej herbacie katechiny [58].

Liczną grupę antymutagenów stanowią bioflawonoidy o charakterze polifenoli (Ryc. 4.). W większości są one wytwarzane przez rośliny i najczęściej wy-



Ryc. 4. Struktura chemiczna flawonoidów.

stępują w wakuolach komórek roślinnych w formie kwasów fenolowych połączonych z cukrami [57]. Wykazano, że fenolokwasy takie jak: kwas kawowy, chlorogenowy i galusowy silnie hamują aktywność mutagenną aflatoksyny AFB₁ w obecności wątrobowej frakcji mikrosomalnej S9. Mutagenesa AFB₁ była całkowicie zahamowana przez 10mM kwas galusowy; w 75% przez 10 mM kwas chlorogenowy i w 40% przez 10 mM kwas kawowy [59]. Przyjmuje się, że mechanizm tych reakcji polegał na wiązaniu silnie mutagennej formy epoksydowej AFB₁ przez związki polifenolowe [60]. Spośród polifenoli silne włas-

ciwości antymutagenne przeciwko AFB₁ wykazuje również kwas elagowy [56, 61]. W tym przypadku dane doświadczalne wskazują, że jednym z mechanizmów hamowania mutageny AFB₁ może być tworzenie kompleksu pomiędzy kwasem elagowym a aflatoksyną [61].

Szeroko rozpowszechnione w świecie roślin wyższych są również furanokumaryny, do których należy psoralen. Związki te mogą występować jako naturalne składniki roślin lub być wytwarzane przez rośliny w odpowiedzi na działanie związków chemicznych, grzybów lub innych patogenów [62-64]. Współdziałając z hormonami regulują one wzrost roślin [65]. Okazało się również, że furanokumaryny wykazują bardzo silne działanie antymutagenne w stosunku do AFB₁ [56].

VI. Podsumowanie

Przemiany, jakim przy udziale cytochromów P450, podlega aflatoksyna AFB₁ w organizmie zwierząt i ludzi prowadzą albo do detoksykacji aflatoksyny, albo do powstania wysoce reaktywnej formy epoksydowej, która tworząc addukty w DNA zapoczątkowuje proces mutagenyzy i kancerogenyzy. Z tego też powodu szczególnie dużo uwagi należy poświęcić mikrobiologicznej kontroli żywności zarówno w procesie produkcji, jak i podczas przechowywania. Natomiast dobrą wiadomością jest występowanie w żywności tak wielkiej ilości naturalnych substancji, głównie pochodzenia roślinnego, które neutralizują mutagenne i kancerogenne działanie mikotoksyn.

Artykuł otrzymano 1 marca 1999 r.

Zaakceptowano do druku 23 sierpnia 1999 r.

Piśmiennictwo

- Betina V (1989) W: *Bioactive Molecules IX*. Elsevier, Amsterdam, Oxford, New York, Tokyo str. 84-98
- CAST (1989) *Mycotoxins: Economical and Health Risks*. Task Force Report No 116, United States Council for Agricultural Science and Technology. Ames Iowa str. 1-91
- Matossian MK (1989) *Poison of the Past*. New Haven and London Yale University Press str. 2-21
- Bullerman LB (1986) *Food Technology* **40**: 59-64
- Hull EP, Green PM, Arst HN Jr, Seazzocchio C (1989) *Mol Microbiol* **3**: 553-559
- Keller NP, Hohn TM (1997) *Fungal Genet Biol* **21**: 17-29
- Bennett JW, Papa KE (1988) *Adv Plant Pathol* **6**: 263-280
- Brown DW, Yu J-H, Keller HS, Fernandes M, Nesbitt TC, Keller NP, Adams TH, Leonard TJ (1996) *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 1418-1422
- Mahanti N, Bhatnager D, Linz JE (1995) *Appl Environ Microbiol* **62**: 191-195
- Watanabe CMH, Wilson D, Linz JE, Townsend CA (1996) *Chem Biol* **3**: 463-469
- Keller NP, Nesbitt C, Sarr B, Phillips TD, Burrow GB (1997) *Phytopathology* **23**: 411-428
- Espeso EA, Tilburn J, Arst HN, Penalva MA (1993) *EMBO J* **12**: 3947-3956
- Tilburn J, Sarkar S, Widdick DA, Espeso EA, Orejas M, Mungroo J, Penalva MA, Arst HN Jr (1995) *EMBO J* **14**: 779-790
- Rucker RR, Yasutake WT, Wolf H (1961) *Prog Frish-Cult* **23**: 3-7
- Harrison JC, Garner RC (1991) *Carcinogenesis* **12**: 741-743
- Ball RW, Wilson DW, Coulombe RA (1990) *Canc Res* **50**: 4918-4922
- Hecht SS, Trushin N (1988) *Carcinogenesis* **9**: 1665-1668
- Busby WF, Wogan GN (1984) W: Searle CE (red) *Chemical Carcinogens* (2nd ed). Washington DC: American Chemical Society, 945-1136
- Essigmann JM, Croy RG, Bennett RA, Wogan GN (1982) *Drug Metab Rev* **13**: 581-602
- Shimada T, Guengerich FP (1989) *Proc Natl Acad Sci USA* **86**: 462-465
- Aoyama T, Yamano S, Guzelian PS, Gelboin HV, Gonzales FJ (1990) *Proc Natl Acad Sci USA* **87**: 4790-4793
- Crespi CL, Penman BW, Steinal DT, Gelboin HV, Gonzalez FJ (1991) *Carcinogenesis* **12**: 355-359
- Yoshizawa H, Uchimarui R, Kamataki T, Kato R, Veno Y (1982) *Cancer Res* **42**: 1120-1124
- Robertson IG, Zeiger E, Goldstein JA (1983) *Carcinogenesis* **4**: 93-96
- Forrester LM, Neal GE, Judah DJ, Glancey MJ, Wolf CR (1990) *Proc Natl Acad Sci USA* **87**: 8306-8310
- Hayes JD, Judah DJ, Neal GE (1993) *Cancer Res* **53**: 3887-3894
- Gurtoo HL, Dave CV (1975) *Cancer Res* **35**: 382-389
- Campbell TC, Hayes JR (1976) *Toxicol Appl Pharmacol* **35**: 199-222
- Gurtoo HL, Dahms RP (1979) *Biochem Pharmacol* **28**: 3441-3449
- Sunouchi M, Fukuhara M, Ohno Y, Takanaka A (1988) *J Toxicol Sci* **13**: 193-204
- Santhanam K, Lotlikar PD (1989) *Cancer Lett* **45**: 129-134
- Daniels JM, Massey TE (1992) *Toxicology* **74**: 19-32
- Liu L, Nakatsu K, Massey TE (1993) *Arch Toxicol* **67**: 379-385
- Gallagher EP, Wienkers LC, Kunze KL, Stapleton PJ, Eaton DL (1994) *Cancer Res* **54**: 101-108
- Ramsdell HS, Parkinson A, Eddy AC, Eaton DL (1991) *Toxicol Appl Pharmacol* **108**: 436-447
- Aoyama T, Yamano S, Guzelian PS, Gelboin HV, Gonzalez FJ (1990) *Proc Natl Acad Sci USA* **87**: 4790-4793
- Raney KD, Shimada T, Kim D-II, Groopman JD, Harris TM, Guengerich FP (1992) *Chem Res Toxicol* **5**: 202-210
- Ueng Y-F, Shimada T, Yamozaki H, Guengerich FP (1995) *Chem Res Toxicol* **8**: 218-225
- Gallagher EP, Kunze KL, Stapleton PL, Eaton DL (1996) *Toxicol Appl Pharmacol* **141**: 595-606
- Harris CC, Hollstein M (1993) *N Engl J Med* **329**: 1318-1327
- Greenblatt MS, Bennett WP, Hollstein M, Harris CC (1994) *Cancer Res* **54**: 4855-4878
- Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC (1991) *Science* **253**: 49-53
- Levine AJ, Momand J, Finlay CA (1991) *Nature* **351**: 453-456
- Puisieux A, Lim S, Groopman J, Ozturk M (1991) *Cancer Res* **51**: 6185-6189
- Bressac B, Kew M, Wands J, Ozturk M (1991) *Nature* **350**: 429-431

46. Hsieh DPH (1985) W: Lacey J (red) *Trichothecenes and Other Mycotoxins*, John Wiley New York, 521-528
47. Calborg FW (1979) *Food Cosmet Toxicol* **17**: 159-166
48. Mc Kay FW (1982) W: Hanson MR, Miller W (red) *Cancer Mortality in the United States 1950-1977*, National Cancer Institute Monograph No 59, 116
49. Hsu IC, Metcalf, RA, Sun T, Welsh JA, Wang NJ, Harris CC (1991) *Nature* **350**: 427-428
50. De Flora S, Ramel C (1988) *Mutat Res* **202**: 285-306
51. Havsteen B (1983) *Biochem Pharmacol* **32**: 1141-1148
52. Wollenweber E, Dietz VH (1981) *Phytochemistry* **20**: 869-932
53. Jongen WMF, Dorgelo FO (1986) *Neth J Agric Sci* **34**: 395-404
54. Brown JP (1980) *Mutat Res* **75**: 243-277
55. Francis AR, Shetty TK, Bhattacharya RK (1989) *Mutat Res* **22**: 393-401
56. Pierzynowska J, Grzesiuk E (1998) *J Anim Feed Sci* **7**: 277-283
57. Harborne JB (1979) *Phytochem Recent Adv* **12**: 457-474
58. Shimoi K, Nakamura Y, Tornita I, Hara Y, Kada T (1986) *Mutat Res* **179**: 239-244
59. Stich HF, Rosin MP (1984) W: Friedman M (red) *Nutritional and toxic aspects of food safety*, J Plenum Press New York, 210-218
60. Bhattacharya RK, Firozi PF (1988) *Cancer Lett* **39**: 85-91
61. Loarca-Pina G, Kuzmicky PA, Gonzalez de Mejia E, Kado NY, Hsieh DPH (1996) *Mutat Res* **360**: 15-21
62. Zobel AM, Brown SA (1989) *Can J Bot* **67**: 915-921
63. Zobel AM, Brown SA (1990) *J Chem Ecol* **16**: 693-699
64. Cisowski W (1983) *Herba Pol* **3-4**: 301-308
65. Hanna-Inaba h, Sato K, Moustacchi E (1989) *Mutat Res* **194**: 121-129

W dniu 6 października 1999 odbyła się w Warszawie w Sali wykładowej Instytutu Biocybernetyki i Inżynierii Biomedycznej PAN

Konferencja na temat „Nowotwory: biologia, genetyka i immunologia”

zorganizowana przez Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego, PAN, Centrum Onkologii-Institut im. Marii Skłodowskiej-Curie, Międzynarodowy Instytut Biologii Molekularnej i Komórkowej.

Program konferencji był następujący:

- E. Bartnik — Nowotwory a geny
- Z. Pojda — Układ immunologiczny a nowotwory
- B. Grzelakowska-Sztabert — Procesy nowotworowe a apoptoza
- M. Balińska — Procesy starzenia się a nowotwory
- P. Janik, M. Małecki — Czynniki angiogenne i antyangiogenne w nowotworach
- S. Piłkuła — Lipidy w komórce nowotworowej
- J. Duszyński — Metabolizm wapniowy w komórkach nowotworowych
- J.A. Siedlecki — Diagnostyka molekularna chorób nowotworowych
- A. Deptuła — Cytokiny a leczenie chorób nowotworowych
- J. Kawiak — Immunoterapia nowotworów w układach modelowych i klinice

Konferencja zgromadziła ponad 300 uczestników z różnych ośrodków krajowych, bowiem dzięki programowi zamieszczonemu we wrześniowym „Świecie Nauki” można było rozpropagować jej tematykę. Konferencję sponsorowały następujące firmy: Alexim/ Becton Dickinson, Bicker, Biokom System, Biomed, Biomibo, HVL-Holding AG, INC Biomedicals, Inlab, InterMedic, JW. Elektronics, Kendro, Kucharczyk — techniki elektryczne, Polatom, Polygen, Prospecta, Symbios. Firma Biokom, Polatom, Kendro przedstawiły dodatkowo swoją ofertę na sali wykładowej. Dzięki sponsorom treść wykładów zostanie opublikowana w formie artykułów przeglądowych w suplemencie „Postępów Biologii Komórki”.

Mediatorzy Konferencji: Małgorzata Balińska i Janusz A. Siedlecki

Kombinatoryczna biosynteza nowych makrolidów i innych poliketydów złożonych

Combinatorial biosynthesis of novel macrolides and other complex polyketides

KATARZYNA KUCZEK¹, MAGDALENA KOTOWSKA²,
KRZYSZTOF PAWLIK³

Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Struktura modułowa kompleksów enzymatycznych katalizujących biosyntezę poliketydów złożonych
- III. Budowa genów syntaz poliketydowych typu I bakterii
- IV. Modyfikacje genetyczne prowadzące do sterowanej biosyntezy poliketydów
 - IV-1. Manipulacje genetyczne w obrębie modułu
 - IV-2. Ekspresja genów syntaz
 - IV-3. Zastosowanie zmienionych produktów pośrednich biosyntezy
- V. Podsumowanie

Wykaz stosowanych skrótów: PKS — syntaza poliketydowa, FAS — syntaza kwasów tłuszczowych, DEBS — syntaza 6-dezokserytronolidu B, KS — syntaza 3-oksoacylowa (syntaza β -ketoacylowa), AT — acylotransferaza, ACP — białkowy czynnik przenoszący grupy acylowe, KR — ketoreduktaza, DH — dehydrataza, ER — enoiloreduktaza, TE — tioesteraza

I. Wstęp

Poliketydy są grupą związków będących produktami metabolizmu wtórnego bakterii, roślin oraz grzybów [1-4]. Pomimo olbrzymiego zróżnicowania pod względem funkcji biologicznej, związki te łączą wspólny schemat biosyntezy. Biosynteza poliketydów przebiega na drodze kondensacji reszt acylowych krótkich kwasów karboksylowych. Pierwotny produkt kondensacji w dalszych etapach biosyntezy podlega reakcjom modyfikującym. Przykłady związków poliketydowych zostały pokazane na Rycinie 1.

Promieniowce rodzaju *Streptomyces* — Gram-dodatnie bakterie glebowe, są najbogatszym źródłem znanych związków poliketydowych. Przeważająca

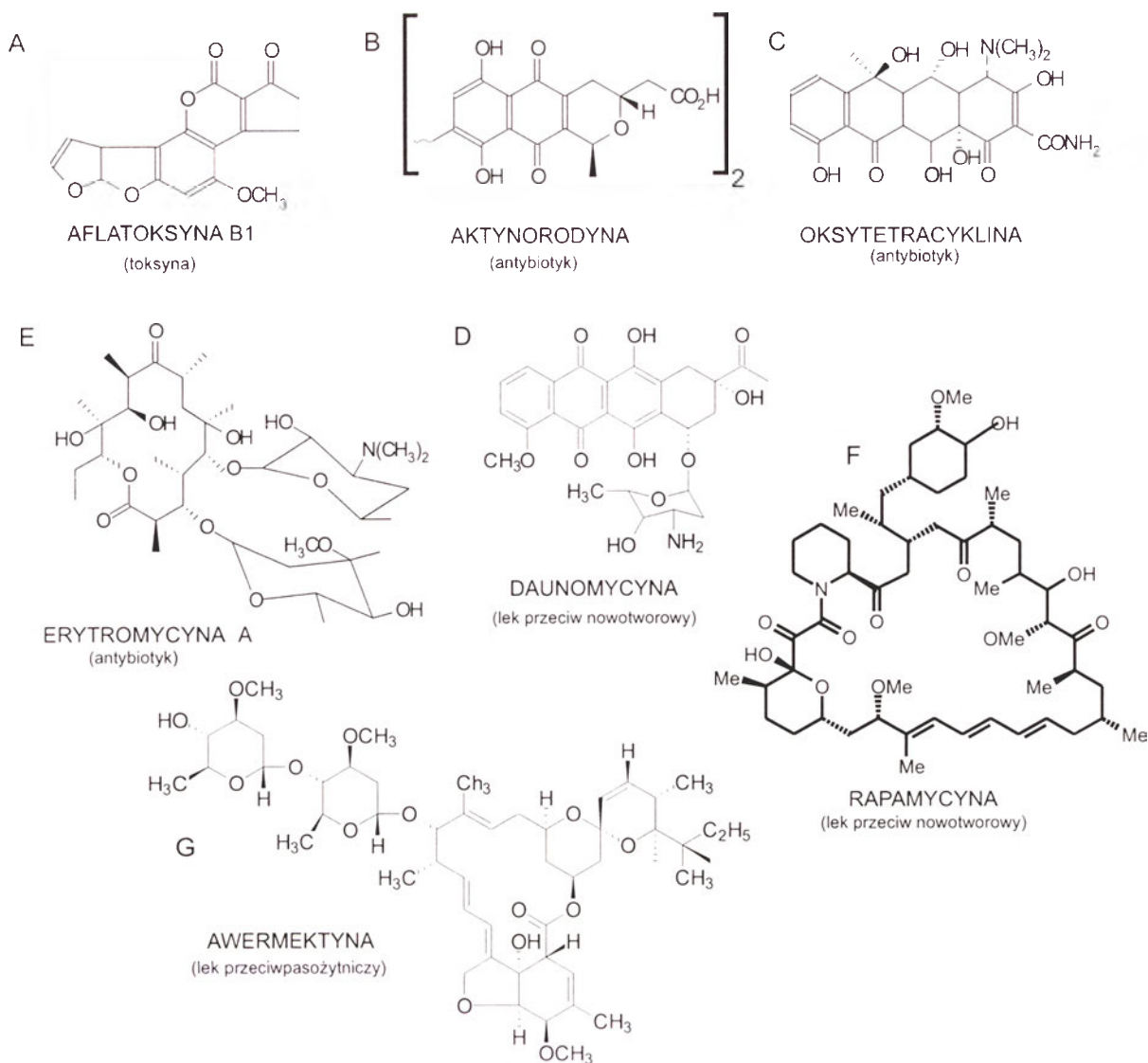
Contents:

- I. Introduction
- II. Modular structure of enzymes catalyzing biosynthesis of complex polyketides
- III. Gene clusters of type I polyketide synthases
- IV. Combinatorial biosynthesis of polyketides through genetic modifications
 - IV-1. Genetic manipulations within a module
 - IV-2. Expression of synthase genes
 - IV-3. Use of alternative biosynthesis intermediates
- V. Concluding remarks

część związków poliketydowych wykazuje aktywność antybiotyczną, często o szerokim spektrum działania. Do najbardziej znanych grup antybiotyków poliketydowych należą makrolidy (erytromycyna, spiramycyna), tetracykliny a także: polieny, polietery i pochodne chinonowe. Niektóre związki poliketydowe posiadają właściwości przeciwnowotworowe (tetracenomycyna, daunomycyna), przeciwgrzybicze (rozeofulwina) bądź immunomodulatorowe (rapamycyna, związek FK506). W przemyśle farmaceutycznym wykorzystywane jest również działanie toksyczne niektórych poliketydów względem płazińców, obleńców i insektów. Znane są również poliketydy działające jako inhibitory enzymów [5-11].

Biosyntezę poliketydów katalizuje układ enzymatyczny syntazy poliketydowej (PKS — ang.: *polyketide synthase*). Proces biosyntezy jest bardzo podobny do biosyntezy długołańcuchowych kwasów tłuszczowych, przeprowadzanej przez kompleks wieloenzymatyczny — syntazę kwasów tłuszczowych (FAS — ang.: *fatty acid synthase*) (Ryc. 2A). Podczas biosyntezy zarówno poliketydów jak i kwasów tłuszczowych zachodzi kilka cykli kondensacji reszt acylowych, których donorem jest koenzym A oraz redukcji grupy karbonylowej powstającego łańcucha węglowego [3, 12, 13]. Produkty pośrednie

¹Dr, ²mgr inż., ³mgr, Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN, ul. Weigla 12, 53-114 Wrocław



Ryc. 1. Przykłady biologicznie aktywnych związków poliketydowych.

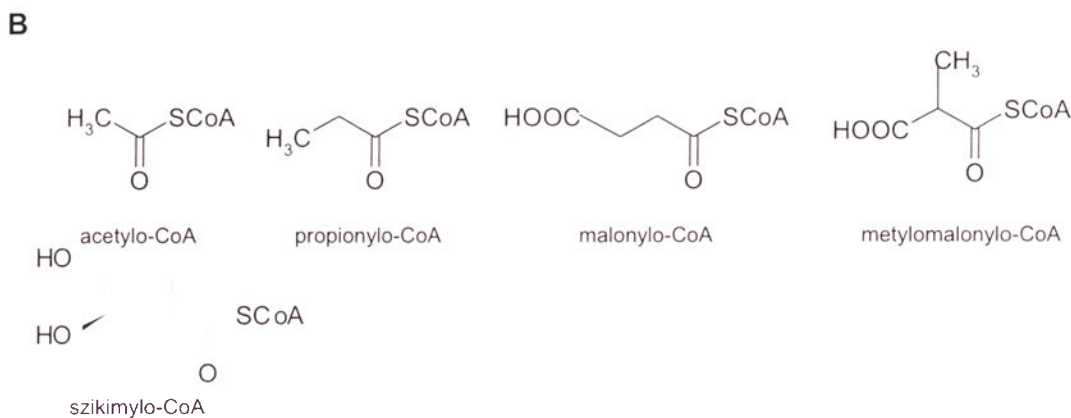
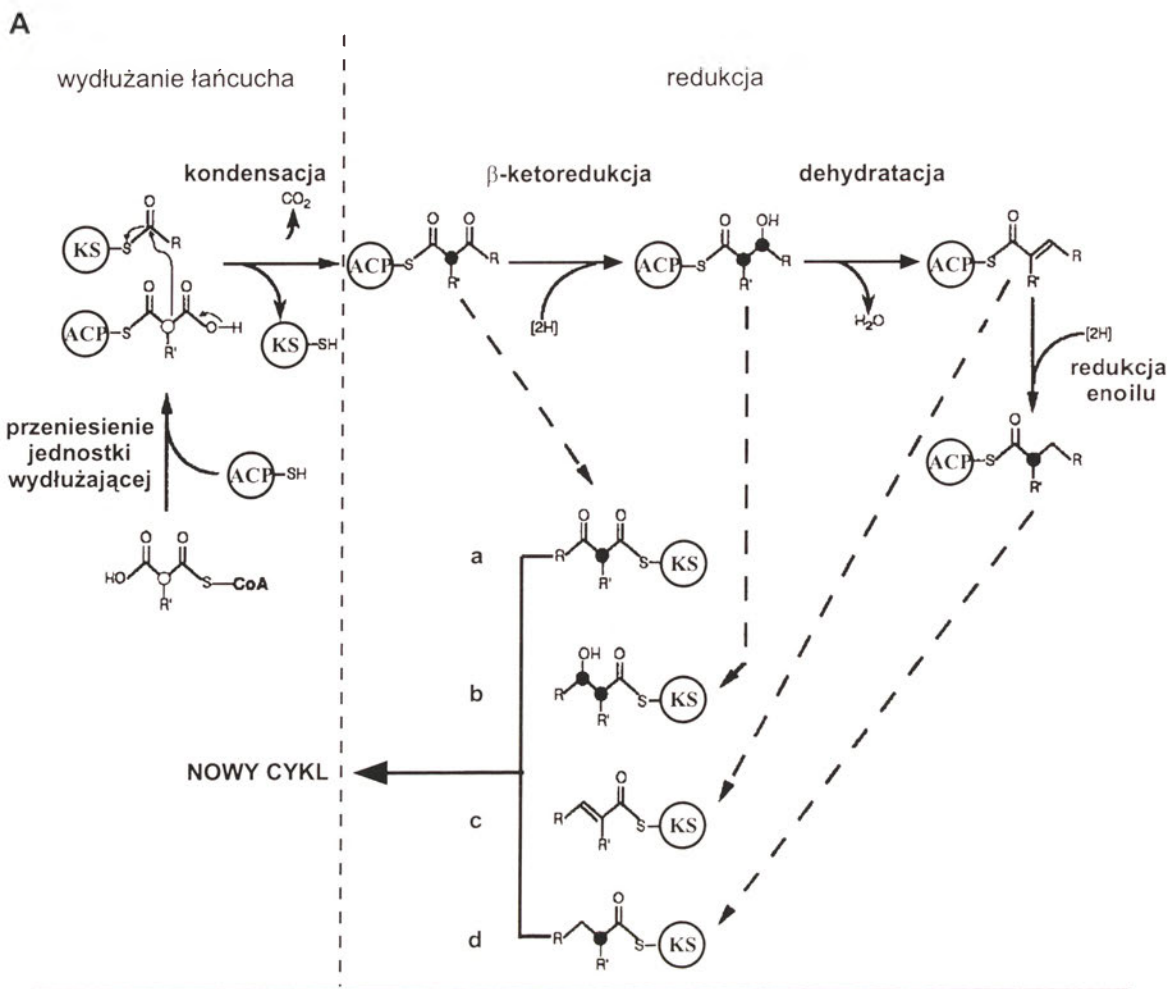
przez cały czas pozostają związane kowalencyjnie (wiązaniami tioestrowymi) z enzymami przeprowadzającymi ich „obróbkę”.

Łańcuch poliketydowy najczęściej nie jest jeszcze biologicznie aktywnym związkiem i podlega dalszym przemianom, tzw. modyfikacjom post-poliketydowym. Do modyfikacji tych należą: metylacje, oksydacje, hydroksylacje oraz występujące we wszystkich prawie związkach glikozylacje [8, 12, 14-18].

Poliketydy, w odróżnieniu od kwasów tłuszczowych, są bardzo zróżnicowane strukturalnie [8]. Jest to wynikiem występowania syntaz poliketydowych różniących się specyficznością substratową względem cząsteczek rozpoczynających syntezę (starterowych) oraz cząsteczek wydłużających łańcuch poliketydowy. Syntazy poliketydowe mogą wykorzystywać różne cząsteczki starterowe (liniowe i rozgałęzione reszty kwasowe, reszty zawierające łańcuch alifatyczny lub pierścień aromatyczny) oraz resztę malonylową lub metylomalonylową do

wydłużania łańcucha, podczas gdy syntazy kwasów tłuszczowych wykorzystują resztę acetylową bądź propionylową jako starter oraz malonylową podczas wydłużania łańcucha. Stopień redukcji grupy karbonylowej łańcucha poliketydu może być różny w kolejnych cyklach kondensacji, wynikiem czego jest pojawienie się różnych grup funkcyjnych (Ryc. 2A, produkty oznaczone a-d). Syntaza FAS przeprowadza natomiast pełną redukcję grupy karbonylowej w każdym cyklu (Ryc. 2A, produkt d). Reakcje kończące syntezę łańcucha poliketydowego (cyklizacja, laktonizacja lub tworzenie wiązania amidowego z aminokwasem) dodatkowo wpływają na zróżnicowanie struktur związków poliketydowych. Dzięki obecności łańcuchów bocznych i różnych grup funkcyjnych, cząsteczki poliketydów zawierają liczne centra chiralne.

Kombinacja różnych substratów w poszczególnych cyklach kondensacji oraz zróżnicowany stopień ich redukcji wpływają na to, że różne syntazy poliketydowe mogą wytwarzać różne warianty struk-



Ryc. 2. A — Proces biosyntezy kwasów tłuszczowych i poliketydów; a) — produkt kondensacji reszt acylowych; b), c) — produkt częściowo zredukowany przy węglu β ; d) — produkt całkowicie zredukowany przy węglu β ; B — Przykładowe substraty w biosyntezie poliketydów.

turalne produktu końcowego o takiej samej liczbie atomów węgla. Ta właściwość syntaz poliketydowych została wykorzystana w procedurach tzw. biotechnologii kombinatorycznej. W ciągu ostatnich kilku lat poznano sekwencję i organizację molekularną wielu genów syntaz poliketydowych oraz genów enzymów przeprowadzających modyfikacje post-poliketydowe. Scharakteryzowano sekwencje odpowiadające domenom enzymatycznym oraz określonej specyficzności substratowej. Zastosowanie metod inżynierii genetycznej, polegających na łączeniu fragmentów genów, pochodzących z róż-

nych syntaz poliketydowych lub manipulacji w obrębie jednego genu pozwala na wywołanie zmian w przebiegu wieloetapowego szlaku biosyntezy poliketydów. W oparciu o znajomość aktywności enzymatycznej i specyficzności substratowej poszczególnych domen kompleksu wieloenzymatycznego syntazy, na zasadach kombinatoryki zostają połączone funkcje enzymatyczne, które w nowym połączeniu wytwarzają zmienione, tzn. inne niż występujące w przyrodzie produkty. Eksperymenty biotechnologii kombinatorycznej będą omówione w sposób bardziej obszerny w rozdziale IV.

Przeprowadzono podział związków poliketydowych na poliketydy aromatyczne (Ryc. 1 A, B, C, D) oraz poliketydy nie zawierające pierścienia aromatycznego (Ryc. 1 E, F, G), zwane poliketydami o strukturze złożonej. Za syntezę tych dwóch grup związków u bakterii, odpowiadają dwa rodzaje układów enzymatycznych syntazy poliketydowej (niearomatycznych — typ I, aromatycznych — typ II), różniące się strukturą i organizacją genetyczną. Typ I syntazy jest analogiczny do syntazy kwasów tłuszczowych kręgowców i grzybów (FAS typu I), a typ II syntazy — do syntazy kwasów tłuszczowych roślin i większości bakterii (FAS typu II) [2, 3, 12, 19-24].

Syntazy poliketydowe typu II prowadzące syntezę poliketydów aromatycznych nie będą tutaj szczegółowo omawiane. Więcej informacji na ich temat znalazło się w poprzednim artykule [3]. Zostaną natomiast omówione syntazy poliketydowe typu I, które stały się przedmiotem wielu badań w zakresie biotechnologii kombinatorycznej.

II. Struktura modułowa kompleksów enzymatycznych katalizujących biosyntezę poliketydów złożonych

Typ I syntaz poliketydowych bakterii reprezentują syntazy makrolidów, poznane głównie u promieniowców. Należy do nich syntaza 6-dezokserytro-nolidu B (DEBS) — aglikonowej części antybiotyku erytromycyny *Saccharopolyspora erythraea* [25] oraz syntazy takich antybiotyków jak: oleandomycyna wytwarzana przez *S. antibioticus* [26], spiramycyna wytwarzana przez *S. ambofaciens* [27], tylozyna wytwarzana przez *S. fradiae* [28] i rifamycyna wytwarzana przez *Amycolatopsis mediterranei* [29, 30]. Do typu I zaliczane są również syntazy immunosupresorów: rapamycyny *Streptomyces hygroscopicus* [31] oraz związku FK506 *Streptomyces sp.* [32, 33], syntaza awermektyny (związek stosowany przeciw obleńcom) *Streptomyces avermitilis* [34] oraz syntaza kwasu orselinowego *Penicillium cyclopium* [35] i syntaza kwasu 6-metylosalicylowego *Penicillium patulum* [36], które syntetyzują najmniejsze znane związki poliketydowe. Syntaza kwasu 6-metylosalicylowego jest pierwszym wyodrębnionym i oczyszczonym białkiem PKS [37].

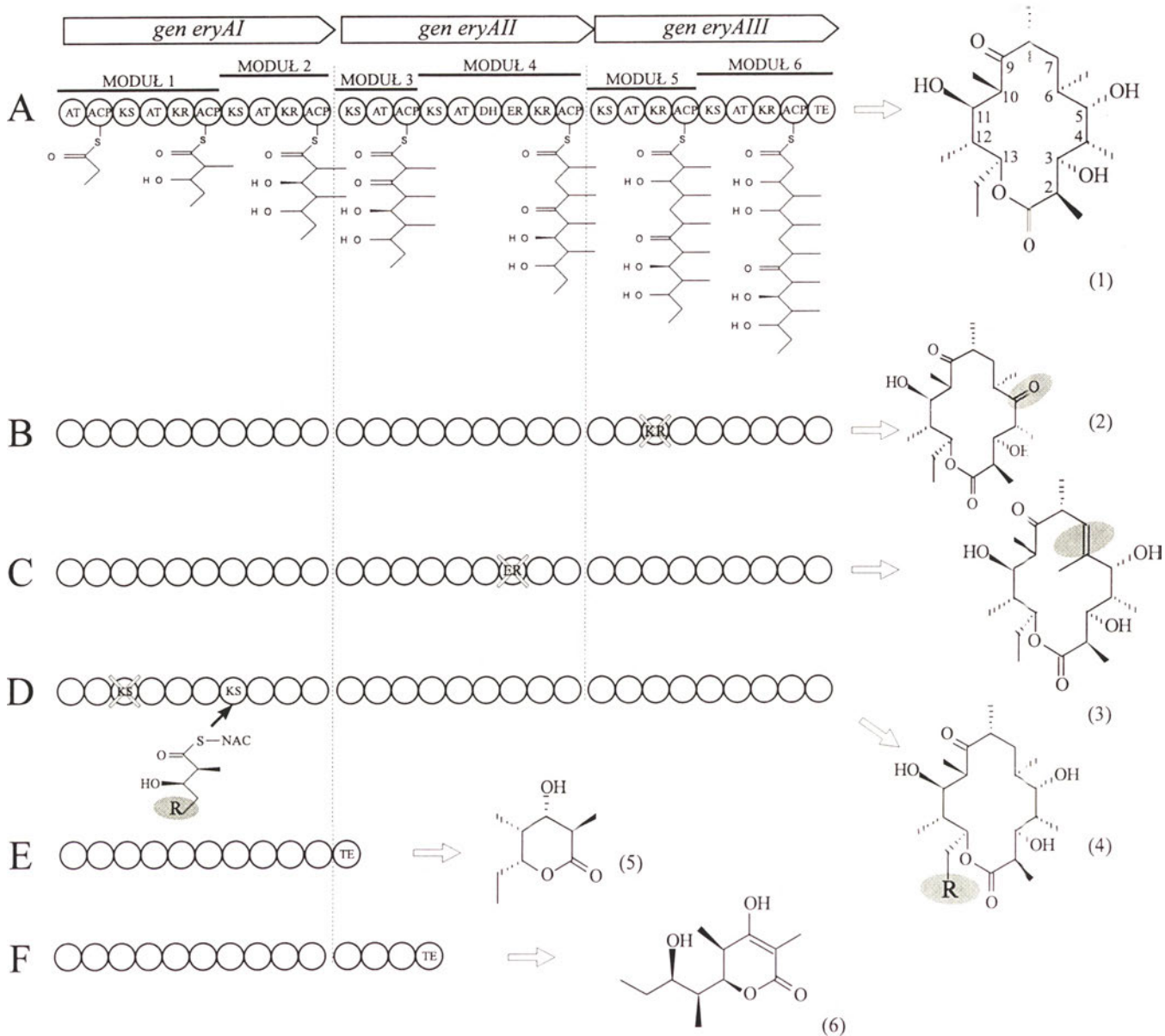
Bakteryjne syntazy poliketydowe typu I to układ kilku multienzymatycznych polipeptydów o dużej masie cząsteczkowej: od 130 000 (syntaza kwasu orselinowego) do 1 070 000 (syntaza rapamycyny). Każdy z tych polipeptydów skupia liczne domeny spełniające funkcje katalityczne. Do najlepiej zbadanych syntaz poliketydowych należy wymieniona wyżej syntaza DEBS z *Saccharopolyspora erythraea*.

Wyizolowano i oczyszczono trzy białka wchodzące w skład tej syntazy — DEBS1, DEBS2 i DEBS3, z których każde ma masę wynoszącą ok. 300 kDa [38-40]. Schemat budowy syntazy DEBS, a także schemat organizacji kodujących ją genów pokazano na rysunku 3A.

W obrębie każdego polipeptydu można wyróżnić regiony zwane modułami. Są to funkcjonalne podjednostki zawierające domeny enzymatyczne potrzebne do przeprowadzenia jednego pełnego cyklu kondensacji i redukcji reszty acylowej włączanej do poliketydu (Ryc. 3A). Domeny acylotransferazowe zawarte w poszczególnych modułach są odpowiedzialne za wybór reszty acylowej podlegającej kondensacji przy udziale domeny ketosyntazowej, a domeny redukcyjne warunkują stopień redukcji reszty acylowej. W skład jednego polipeptydu wchodzi zwykle 2 lub 3 moduły, może być ich więcej, np. w syntazie awermektyny — 4, a w jednym z polipeptydów syntazy rapamycyny — aż 6 modułów [24].

Sekwencja aminokwasowa domen enzymatycznych oraz ich funkcja przypomina odpowiednie domeny enzymów FAS. Są to: syntaza 3-oksoacylowa (syntaza 3-oksoacyl:ACP), nazywana popularnie syntazą β -ketoacylową lub ketosyntazą (KS), acylotransferaza (transferaza acetylo-CoA/malonylo-CoA:ACP) (AT), białkowy czynnik przenoszący grupy acylowe (ACP). Oprócz wymienionych domen podstawowych, odpowiedzialnych za kondensację, moduł może zawierać zróżnicowaną ilość domen redukcyjnych: KR — ketoreduktaza, DH — dehydrataza i ER — enoiloreduktaza, w zależności od stopnia redukcji reszty acylowej w danym cyklu. Na N-końcu pierwszego modułu znajdują się domeny: AT i ACP stanowiące tzw. moduł starterowy wprowadzający pierwszą resztę acylową do kondensacji z resztą wydłużającą. Na C-końcu ostatniego modułu syntazy występuje zazwyczaj domena tioesterazowa (TE) odpowiedzialna za hydrolizę wiązania tioestrowego i uwolnienie łańcucha poliketydu [3, 8, 10]. Kolejność ułożenia domen w module odpowiada kolejności przeprowadzanych reakcji.

Przeprowadzono badania nad właściwościami fizycznymi syntazy DEBS stosując techniki: wirowania równowagowego, ograniczonej proteolizy i generowania wiązań krzyżowych między domenami z różnych modułów. W wyniku niepełnej proteolizy polipeptydów syntazy DEBS można uzyskać fragmenty odpowiadające nienaruszonym modułom. Wskazuje to na występowanie upakowanej struktury w obrębie modułów i wyeksponowanych na proteoli-



Ryc. 3. Syntaza 6-dezokserytronolidu B *Saccharopolyspora erythraea*; A — Organizacja genetyczna, układ domen w polipeptydach kompleksu enzymatycznego syntazy oraz produkty pośrednie kolejnych etapów biosyntezy; *eryA*, *eryAI*, *eryAIII* — geny syntazy; DEBS 1 — 3 - polipeptydy syntazy; objaśnienia pozostałych skrótów w tekście. A — 6-dezokserytronolid B (1) wytwarzany przez nie zmienioną syntazę; B-F — modyfikacje genetyczne syntazy DEBS; B — delekcja domeny KR modułu 5 powoduje wytworzenie 5 okso-pochodnej (2); C — nieczynne domeny ER modułu 4 powoduje wytworzenie 6,7 anhydro-pochodnej (3); D — wprowadzenie diketydu bezpośrednio do KS w module 2 przy nieczynnej domenie KS w module 1, zmiany struktury związku (4) uwarunkowane są strukturą reszty R (R = wócor, reszta etylowa lub fenylowa); E — skrócona syntaza DEBS składająca się z DEBS1 i domeny TE wytwarza triketyd (5); F — skrócona syntaza DEBS składająca się z DEBS1, modułu 3 i domeny TE wytwarza tetraketyd (6).

zę regionów łączących. W pewnych warunkach *in vitro*, wyodrębnione moduły mogą samodzielnie prowadzić kondensację i redukcję łańcucha poliketydowego [41, 42].

Na podstawie doświadczeń z zastosowaniem odczynników sieciujących określono sąsiedztwo centrów aktywnych pomiędzy modułami sąsiadującymi w strukturze przestrzennej białka. Badania dotyczyły centrów zawierających grupy tiolowe, uczestniczących w kondensacji: syntazy β -ketoacylowej i białka przenoszącego reszty acylowe. Na podstawie

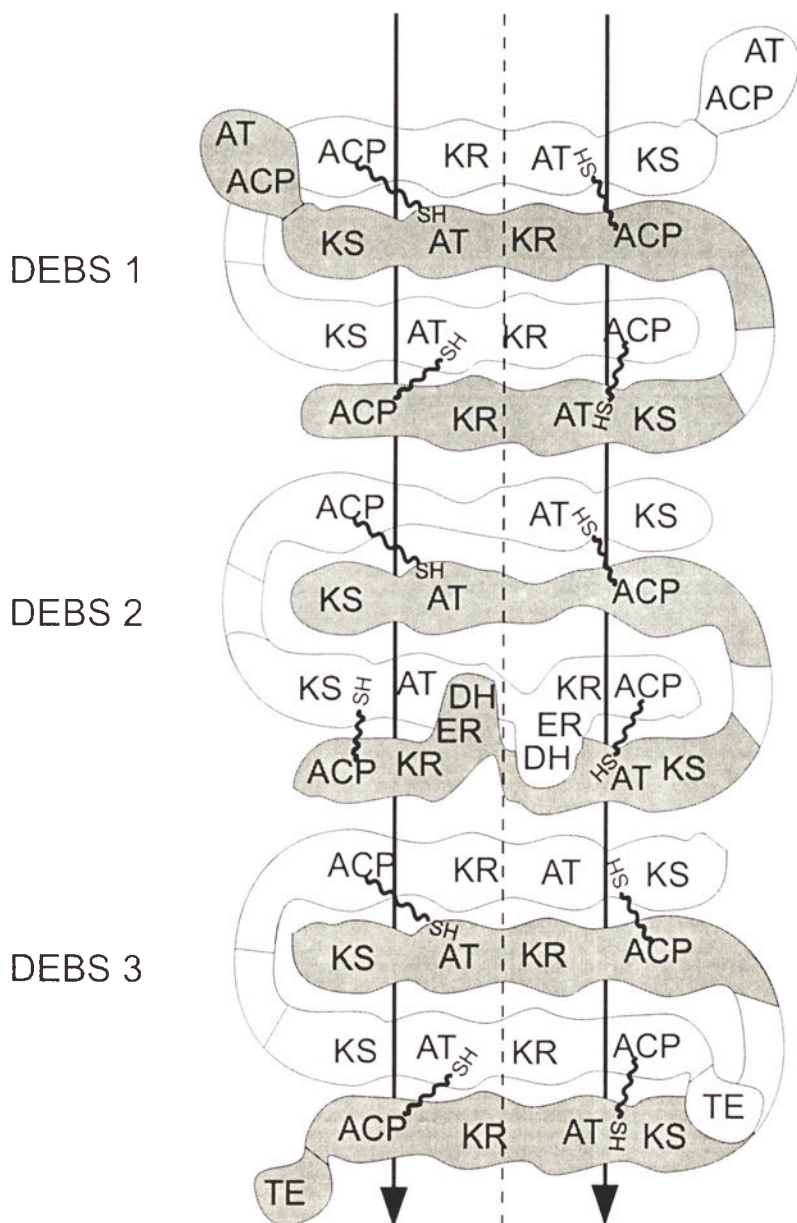
tych badań wnioskowano o powstanie funkcjonalnych par centrów aktywnych: KS-ACP, z których każde zlokalizowane jest na innym łańcuchu białkowym (Ryc. 4). Wysunięto hipotezę, że również kompleks enzymatyczny o strukturze natywnej jest dime-rem, w którym identyczne moduły są zasocjowane przeciwnie — „głowa-ogon”. Domeny: KS, AT i ACP tworzą strukturę helikalną a domeny redukcyjne tworzą pętle wystające poza helikalny rdzeń, ale pozostające w zasięgu fosfopantoteinowego ramienia ACP. Taka organizacja umożliwia ciąg konden-

sacji reszt acylowych przy udziale domen zlokalizowanych na różnych polipeptydach i tworzących w ten sposób nowe, funkcjonalne jednostki odpowiadające modułom (domeny: KS i AT aktywne w jednym cyklu są zlokalizowane na jednym polipeptydzie, a domena ACP oraz domeny redukcyjne aktywne w tym samym cyklu — na polipeptydzie zorientowanym przeciwbieżnie) (Ryc. 4). Opisany model funkcjonowania syntazy poliketydowej potwierdziły doświadczenia rekonstrukcji aktywnych kompleksów syntazy z zastosowaniem białek o zmutowanych domenach KS i ACP [39, 43-45].

III. Budowa genów syntaz poliketydowych typu I bakterii

Geny kodujące syntazy poliketydowe są zawsze zgrupowane na chromosomie bakteryjnym i jeśli określony związek ma aktywność antybiotyczną, to-

warzą im geny oporności [24]. Zespoły genów syntaz typu I składają się z długich otwartych ramek odczytu, które kodują opisane wcześniej wieloenzymatyczne białka syntazy. Ramki odczytu mają długość od 10 tys. pz (geny syntazy DEBS) do 30 tys. pz (geny syntazy awermektyny i rapamycyny), odpowiednio do liczby modułów. Pierwszym zbadanym zespołem genów PKS typu I promieniowców są geny syntazy DEBS *Saccharopolyspora erythraea*, które zostały wyodrębnione jako region DNA znajdujący się po stronie 3' genu oporności na erytromycynę *ermE* i transkrybowany w przeciwnym kierunku w stosunku do tego genu [8, 10, 46]. Zbadanie i porównanie kolejnych zespołów genów PKS I dostarczyło informacji dotyczących struktury domenowej i przypuszczalnej sekwencji aminokwasowej domen. Sekwencja aminokwasowa w rejonie centrum aktywnego odpowiadających sobie domen: KS, AT i ACP różnych syntaz charakteryzuje się dużą zachowaw-



Ryc. 4. Model funkcjonalnego kompleksu enzymatycznego syntazy 6-dezoksyerytro-nolidu B. Białka DEBS1, DEBS2 i DEBS3 tworzą dimery połączone w jedną strukturę helikalną. Funkcjonalne moduły są utworzone przez domeny enzymatyczne zlokalizowane na siostrzanych peptydach i pozostające w zasięgu fosfopantoteinowego ramienia ACP (linia falista). Kompleks enzymatyczny może katalizować jednocześnie syntezę dwóch łańcuchów poliketydowych. Kierunek przebiegu syntez oznaczono strzałkami. Objasnienia skrótów w tekście.

czością. Dzięki analizie porównawczej sekwencji różnych syntaz udało się również wyznaczyć granice domen biorących udział w redukcji (KR, DH, ER), które nie wykazują tak wysokiego podobieństwa sekwencji jak domeny podstawowe [39, 47]. Analiza organizacji i sekwencji genów PKS umożliwiła wyciągnięcie wniosków dotyczących specyficzności substratowej domen białek syntazy oraz struktury tych dużych kompleksów enzymatycznych. Charakterystyczną cechą zespołów genów syntaz jest znaczna długość poszczególnych genów, występowanie na końcu 5' całego zespołu genów sekwencji domen odpowiedzialnych za rozpoczęcie biosyntezy (występujących w niektórych syntazach jako osobny gen) i występowanie sekwencji domeny tioesterazowej na końcu 3' zespołu genów. Następujące po sobie geny mogą być transkrybowane w przeciwnym kierunku, jednakże ułożenie domen w poszczególnych genach odpowiada kolejności reakcji kondensacji i redukcji w danym cyklu [24].

IV. Modyfikacje genetyczne prowadzące do sterowanej biosyntezy poliketydów

Badania nad poliketydami wytwarzanymi przez promieniowce zmierzają do uzyskania nowych związków aktywnych biologicznie. Działanie naturalnych systemów oporności mikroorganizmów, aktywnych wobec antybiotyków stosowanych powszechnie, można wyeliminować przez zastosowanie w terapii nowych związków. Celem tych poszukiwań jest również zwiększenie skuteczności terapeutycznej i zmniejszenie skutków ubocznych stosowanych leków.

Układ domen enzymatycznych syntaz poliketydowych typu I oraz ich organizacja genetyczna odzwierciedla strukturę wytwarzanych poliketydów. Kolejność ułożenia domen występujących w poszczególnych modułach białek syntazy odpowiada kolejności reakcji biosyntezy (Ryc. 3A). Każdy moduł syntazy i każda domena modułu są kodowane przez osobny region genu i sąsiadują ze sobą w liniowej strukturze białka. Każda domena enzymatyczna jest aktywna tylko raz podczas biosyntezy, a ingerencja w określony region genu oznacza zmianę w przebiegu pojedynczej reakcji. Te właściwości syntaz poliketydowych narzucają sposób możliwych zmian genetycznych, które mogą prowadzić do uzyskania poliketydów innych niż warunkowane przez określony zespół genów.

Można teoretycznie obliczyć, jaką liczbę różnych łańcuchów poliketydowych można uzyskać modyfikując dany zespół genów syntazy [48]. W rozwa-

żaniach tych bierzemy pod uwagę następujące parametry: liczbę różniących się specyficznością domen acylotransferazy rozpoczynających syntezę (AT_L), liczbę różniących się specyficznością domen acylotransferazy działających się w kolejnych cyklach wydłużenia (AT_E), liczbę enzymów decydujących o stopniu redukcji ($KS+KR+DH+ER=4$) oraz liczbę cykli biosyntezy, której odpowiada liczba modułów (M). Jest to tzw. potencjał kombinatoryczny syntazy poliketydowej (PK) wyrażający się wzorem:

$$PK=AT_L \times (AT_E \times 4)^M$$

Teoretyczny zbiór kombinacji strukturalnych poliketydów jest znacznie szerszy niż zbiór określony powyższym wzorem, który nie uwzględnia takich czynników wpływających na zróżnicowanie struktur jak: stereospecyficzność reakcji prowadzonej przez acylotransferazę i ketoreduktazę, oraz działanie czynników modyfikujących. W praktyce, możliwość uzyskania dzięki manipulacjom genetycznym zróżnicowanych struktur poliketydowych jest ograniczona specyficznością substratową enzymów biorących udział w wieloetapowej syntezie.

Badania nad uzyskaniem na drodze biologicznej poliketydów o „nienaturalnej” strukturze dotyczą przede wszystkim syntazy DEBS *Saccharopolyspora erythraea*, której układ enzymatyczny oraz zespół kodujących ją genów stanowią pierwszy dobrze poznany system typu I. Ostatnie badania, które doprowadziły do poznania zespołu genów również innych syntaz typu I: awermektyny, oleandomycyny, rapamycyny, spiramycyny, tylozyny, związku FK506 i rifamycyny potwierdziły charakter „modułowy” organizacji genów tych syntaz i zapoczątkowały doświadczenia nad otrzymywaniem zmienionych strukturalnie poliketydów wytwarzanych przez te syntazy [49-56].

Alternatywny, względem metod biotechnologicznych, sposób otrzymywania różnorodnych związków chemicznych o potencjalnej aktywności farmakologicznej oferują metody chemii kombinatorycznej. W wyniku syntezy chemicznej uzyskiwane są warianty strukturalne tworzące tzw. biblioteki kombinatoryczne określonego związku. Związki te są sprawdzane pod względem właściwości biologicznych. Metody chemii kombinatorycznej zastosowano w syntezie peptydów [57], rybozymów [58] a także innych, biologicznie aktywnych związków organicznych [59]. Poważnym ograniczeniem w stosowaniu metod syntezy chemicznej są trudności w syntezie związków o dużej liczbie centrów chiralnych [29, 30]. Związki takie mogą być wytwarzane przez mikroorganizmy. Stale wzrasta więc zainteresowanie biotechnologią kombinatoryczną natural-

nych polimerów: poliketydów i antybiotyków peptydowych [60-62].

IV-1. Manipulacje genetyczne w obrębie modułu

Podstawową jednostką funkcjonalną syntaz poliketydowych typu I jest moduł. Zaobserwowano, że powstałe w wyniku mutacji zmiany aminokwasów unieczynnijające domeny KS modułów od N-końca białek DEBS nie wpływają na aktywność modułów położonych dalej tj. w kierunku C-końca tych białek. Przekonano się o tym w wyniku doświadczenia, w którym do komórek z unieczynnioną domeną KS pierwszego modułu podawano substrat będący jednocześnie metabolitem pośrednim na drodze biosyntezy. Jest to diketyd — produkt kondensacji starterowej cząsteczki propionylowej z resztą metylomalonylową (Ryc. 3D). Związek taki, choć nie występuje w postaci wolnej, jest normalnym produktem kondensacji prowadzonej przez domenę KS z modułu 1. Został on „zaakceptowany” przez domenę KS z modułu 2, ulegał kondensacji i modyfikacji przez dalsze moduły, aż do uzyskania oczekiwanego, nie zmienionego produktu końcowego 6-dezokserytronolidu B [43, 44].

Kolincarność domen kodowanych w obrębie genów oraz porządku reakcji katalizowanych przez domeny enzymatyczne została wykorzystana w doświadczeniach inaktywacji pojedynczych domen redukcyjnych przez wprowadzenie odpowiednich mutacji w kodujących je genach. W wyniku delecji (w obrębie genu) została unieczynniona domena ketoreduktazowa modułu 5 syntazy DEBS, a w wyniku ukierunkowanej mutagenyzy została unieczynniona domena enoiloreduktazowa modułu 4 tej syntazy [8] (Ryc. 3B-C). Mutanty zawierające nieaktywną domenę redukcyjną wytwarzały niezredukowane pochodne erytromycyny, odpowiednio: 5-okso-pochodną i anhydro-pochodną.

Strategią alternatywną do mutacji genu jest tworzenie genów mozaikowych, o zmienionej funkcji. Klonowano pojedynczy gen kodujący polipeptyd posiadający aktywności dwóch pierwszych modułów syntazy w połączeniu z fragmentem genu kodującym końcową domenę tioesterazową. Ten układ genetyczny otrzymał nazwę DEBS1 + TE (Ryc. 3E). Wprowadzono do niego, na miejsce aktywnej domeny KR modułu 2, region odpowiadający domenie ketoreduktazy z modułu 3 DEBS, gdzie występuje ona jako domena nieaktywna. W wyniku tej wymiany domen otrzymano, zgodnie z oczekiwaniem, niezredukowany triketyd jako produkt zmienionego układu enzymatycznego. Triketyd — produkt dwóch kolej-

nych kondensacji, jest pierwszym stabilnym produktem pośrednim nie zmodyfikowanej syntazy (Ryc. 3E). W podobny sposób przeprowadzono wymianę tej samej domeny KR z DEBS1+TE na dwie domeny biorące udział w redukcji poliketydu — KR i DH z syntazy rapamycyny *Streptomyces hygroscopicus*. Wynikiem tej zmiany było otrzymanie przewidywanego związku zawierającego wiązanie podwójne zamiast grupy hydroksylowej [62]. Wymiana domen redukcyjnych pomiędzy genami syntaz, jak stwierdzono na podstawie analizy ich sekwencji, jest możliwa dzięki występowaniu stosunkowo długich, okalających je regionów DNA, którym nie przypisano określonych funkcji biologicznych. Dla modyfikacji genetycznych mogą służyć jako regiony wyznaczające zakres wymienianego DNA i oddzielające miejsca o określonej funkcji katalitycznej.

W natywnym białku syntazy domeny redukcyjne tworzą pętle znajdujące się poza strukturami helikalnymi a ich wymiana nie zmienia tej struktury [8, 41, 66]. Okazało się jednak, że wymiana fragmentów DNA między zespołami genów PKS może dotyczyć także domen acylotransferazowych, wchodzących oprócz KS i ACP, w skład helikalnego rdzenia syntazy (Ryc. 4). W zespole genów syntazy platenolidu *Streptomyces ambofaciens* (aglikonowej części antybiotyku makrolidowego spiramycyny) wymieniono sekwencję kodującą moduł pełniący funkcję wyboru reszty starterowej na sekwencję modułu starterowego z zespołu genów syntazy tylaktonu *Streptomyces fradiae* (aglikonowej części makrolidu tylozyny). W wyniku ekspresji mozaikowych genów otrzymano poliketyd zawierający dodatkową grupę metylową odpowiadającą wprowadzeniu przez syntazę propionylowej reszty starterowej zamiast reszty acetylowej. Nowy związek poliketydowy wytwarzany był w ilościach porównywalnych do naturalnego produktu syntazy. Pozostaje do zbadania wpływ uzyskanej modyfikacji na aktywność antybakteryjną związku. Modyfikacja erytromycyny A w analogicznym regionie cząsteczki wpływa bowiem na jej aktywność wobec szczepów opornych na makrolidy [67].

Pierwsza domena acylotransferazowa syntaz, która wprowadza cząsteczkę starterową, wykazuje pewną tolerancję względem „nienaturalnych” substratów. Dotyczy to szczególnie układu DEBS1 + TE [53, 68]. Wprowadzenie substratu innego niż naturalny pociąga za sobą utworzenie zmienionego produktu cząstkowego. W przypadku syntazy składającej się z kompleksu wszystkich trzech białek, produkt ten, na skutek zmienionej struktury, nie zawsze zostaje rozpoznany jako substrat przez kolejno działające enzymy cyklu.

Syntaza makrolidowego związku — awermektyny może rozpoczynać syntezę poliketydu wykorzystując ponad 40 alternatywnych substratów — kwasów karboksylowych, których reszty najczęściej stanowią rozgałęziony łańcuch węglowy [69-71]. Tę tolerancję substratową starterowej domeny AT syntazy awermektyny wykorzystano tworząc mozaikę genów syntazy awermektyny z genami syntazy DEBS pozbawionej własnej domeny starterowej. W zespole genów awermektyny, podobnie jak w DEBS, występuje sekwencja kodująca starterowy moduł składający się z dwóch domen: AT i ACP. Fragment DNA kodujący moduł starterowy syntazy awermektyny klonowano w miejscu odpowiedniego fragmentu w układzie DEBS1 + TE. Układ enzymatyczny powstały w wyniku ekspresji mozaiki genów jest zdolny do wykorzystywania szerszego niż DEBS zakresu alternatywnych cząsteczek starterowych, także o rozgałęzionym łańcuchu węglowym i wytwarza nowe pochodne naturalnego produktu triketydowego.

Klonowanie powtórzono w kompletnym zestawie genów DEBS aby przekonać się o wpływie zmiany startera na dalsze etapy syntezy poliketydu, rozpoznanie substratowe dalszych podjednostek syntazy oraz aktywność antybiotyczną powstających pochodnych erytromycyny. Doświadczenia te wykazały olbrzymi potencjał funkcjonalny syntazy DEBS oraz pozostałych enzymów szlaku biosyntezy erytromycyny, wykazujących tolerancję względem zmienionych substratów. W wyniku przeprowadzenia opisanych badań otrzymano wiele nowych pochodnych erytromycyny A. Niektóre spośród nich charakteryzowały się wysoką aktywnością antybiotyczną [71].

W przeciwieństwie do starterowych domen AT, zróżnicowanych pod względem specyficzności substratowej, domeny acylotransferazowe aktywne w kolejnych cyklach kondensacji są najczęściej specyficzne względem malonylo-CoA albo metylomalonylo-CoA i włączają do poliketydu resztę acetylową albo propionylową. Zaobserwowano, że na podstawie analizy sekwencji aminokwasowej tych domen można dokonać podziału domen AT pod względem specyficzności substratowej [72, 73]. Zbadano wymiennalność domen AT dwóch pierwszych modułów syntazy DEBS, warunkujących włączanie propionianu, na domeny AT włączające octan i pochodzące z innych syntaz. Rekombinanty wytwarzały nowe pochodne erytromycyny, nie zawierające grupy metylowej w odpowiedniej pozycji pierścienia makrolidowego, a jeden z rekombinantów wydajnością produkcji dorównywał szczepowi niezmutowanemu.

Dwa spośród trzech typów rekombinantów zawierały sekwencje domeny AT pochodzące z zespołu genów PKS, których produkt poliketydowy nie jest znany. Charakterystykę domen AT kodowanych przez te geny przeprowadzono wyłącznie w oparciu o analizę sekwencji nukleotydowych [55, 74]. Doświadczenie to wskazuje na możliwość zastosowania jedynie częściowo scharakteryzowanych genów PKS typu I w inżynierii genetycznej poliketydów o strukturze złożonej.

IV-2. Ekspresja genów syntaz

Zwiększenie możliwości otrzymania nowych związków poliketydowych można uzyskać przez zastosowanie oczyszczonego kompleksu enzymatycznego syntazy, prowadzącego biosyntezę poliketydów *in vitro*. W wyizolowanym kompleksie enzymatycznym, w którym przenikalność substratów, w tym także zmodyfikowanych, jest praktycznie nieograniczona, można stosunkowo łatwo określić specyficzność substratową domen syntazy. W tym celu klonowano cały zespół genów DEBS w wektorze plazmidowym. Znalazły się tam pod kontrolą silnego, konstytutywnego promotora, pochodzącego z operonu aktynorodyny (poliketyd aromatyczny) oraz specyficznego aktywatora transkrypcyjnego. Ekspresję klonowanych genów badano w komórkach *Streptomyces coelicolor*, nie posiadających zespołu genów aktynorodyny [49]. Oczyszczono białka syntazy DEBS, będące produktem ekspresji klonowanych genów. Posłużyły one jako modelowy układ, do którego w sposób kontrolowany wprowadzono substraty [42, 63].

Oprócz całego zespołu genów syntazy DEBS klonowano, opisany przez nas wcześniej pojedynczy gen syntazy DEBS w połączeniu z fragmentem genu kodującym końcową domenę tioesterazową (DEBS1 + TE) [38, 43]. W wyniku ekspresji uzyskano hybrydowe białko. Białko to *in vitro*, w stanie oczyszczonym, przekształca podane substraty w triketyd — produkt dwóch kolejnych kondensacji. Produkt ten ma strukturę laktonu (Ryc. 3E). Dzięki swojej prostocie i dużej wydajności uzyskiwania triketydów, układ DEBS1 + TE zastosowano w wielu eksperymentach, w których przez określenie specyficzności substratowej domen oczekuje się rozwiązań pomagających w uzyskaniu związków o zaplanowanej strukturze. Zaobserwowano, że DEBS1 + TE wykazuje tolerancję względem starterowej reszty acylowej, włączając oprócz propionylowej także resztę acetylową lub butyrylową [43, 44, 55]. Substratem dla DEBS1 + TE może być także diketyd — produkt

pierwszej kondensacji. Stosując diketydowy substrat wykazano, że to właśnie domena KS z modułu 2 jest jego akceptorem. Tym samym dwie domeny KS różniącą, jaki substrat zostanie poddany dalszej kondensacji. Wykazano także, że DEBS1 + TE przekształca podane *in vitro* substraty w sposób selektywny pod względem stereochemicznym. Oznacza to, że wykorzystuje substraty o określonej konfiguracji oraz dokonuje zmiany konfiguracji w obrębie powstającego produktu [47, 63, 64].

Oprócz wymienionych białek syntazy otrzymano kompleksy składające się z białka DEBS1 oraz modułu 3 z domeną tioesterazową, która podczas klonowania została umieszczona na końcu modułu 3 [40] (Ryc. 3F), a także kompleks składający się z dwóch kompletnych białek: DEBS1, DEBS2 oraz modułu 5 i domeny tioesterazowej [65]. Wszystkie te kompleksy białek powstały przez ekspresję części naturalnego zespołu genów wraz z fragmentem genu kodującym domenę tioesterazy. Wytwarzają one nowe związki poliketydowe i są przedmiotem badań nad kinetyką enzymatyczną zmodyfikowanego kompleksu enzymatycznego.

Aby określić w sposób ilościowy specyficzność substratową, zbadano parametry kinetyczne — stałe katalityczne k_{kat} i stałe równowagi reakcji K_m dla określonych substratów zarówno w systemie DEBS1 + TE jak i w pełnym kompleksie syntazy (DEBS1 + DEBS2 + DEBS3) *in vitro* [53]. Badania te wskazują na selektywność substratową domen syntazy. Selektywność ta wynika z drugo- i trzeciorzędowej struktury białek syntazy a nie jest wynikiem czysto mechanicznego zestawienia domen kontrolujących wieloetapową syntezę. Do wyznaczenia parametrów kinetycznych posłużyły białka syntazy oczyszczone do stanu homogennego. Mimo, że są to białka o dużej masie (DEBS1 + TE — 410 kDa) otrzymano je jako aktywne podjednostki [40].

Opisane badania nad kinetyką enzymatyczną naturalnej i zmodyfikowanej syntazy poliketydowej pozwalają na lepsze poznanie sposobu funkcjonowania tych skomplikowanych kompleksów enzymatycznych i służą temu, aby w praktyce można było lepiej wykorzystać potencjał kombinatoryczny syntaz.

IV-3. Zastosowanie zmienionych produktów pośrednich biosyntezy

Jeszcze inny sposób ingerencji w strukturę poliketydu polega na zastosowaniu zmodyfikowanych prekursorów z ominięciem pierwszych etapów syntezy poliketydu. Już wcześniej opisano włączanie diketydu — produktu dwóch pierwszych kondensacji przez

syntazę DEBS1 + TE [68]. Procedurę tę wykorzystywano wielokrotnie podczas badania specyficzności substratowej syntaz. Stwierdzono np. zdolność syntazy naringenicyny *Nocardia argentinensis* do włączania jednostki pentaketydowej (produkt pięciu kondensacji poliketydowych) jako prekursora makrolidu powstającego łącznie w wyniku dziewięciu kondensacji [75]. Jest to najdłuższy oraz najbardziej złożony poliketyd jaki został dotychczas wykorzystany przez zespół enzymatyczny z ominięciem naturalnej drogi biosyntezy. Wprowadzane podczas biosyntezy poliketydu prekursorzy współzawodniczą o miejsca aktywne syntazy z prekursorami naturalnymi. W rezultacie powstaje mieszanina związków: o strukturze naturalnej oraz wydłużonych prekursorów nienaturalnych.

W zespole genów syntazy DEBS wprowadzono mutację powodującą wyłączenie aktywności domeny KS pierwszego modułu. W ten sposób nie mógł powstawać naturalny produkt, a wyłącznie jego pochodne powstające w wyniku włączania do syntezy nienaturalnych produktów pośrednich — triketydów o rozbudowanych resztach, zawierających pierścień aromatyczny, nasycony łańcuch węglowy, bądź triketydów o konfiguracji stereochemicznej nie występującej w naturalnych substratach [44] (Ryc. 3D). Wykorzystanie nienaturalnych substratów przez syntazę DEBS ujawnia jej dużą tolerancję względem związków o zmienionej strukturze. Pozostałe enzymy szlaku biosyntezy erytromycyny A także do pewnego stopnia wykazują tolerancję względem zmienionych substratów. Zastosowanie nienaturalnych substratów w biosyntezie erytromycyny wywołuje zmiany w regionie 12-15 atomu węgla cząsteczki. Modyfikacje w tym regionie, jak stwierdzono na podstawie wcześniejszych badań nad półsyntetycznymi pochodnymi erytromycyny A, wpływają na zwiększoną aktywność związku względem szczepów opornych [76]. Zmodyfikowane cząsteczki, powstające na drodze biosyntezy są sprawdzane pod względem ich właściwości farmakologicznych i możliwości wykorzystania jako leki. Dzięki zastosowaniu zmodyfikowanych prekursorów biosyntezy zawierających reaktywne grupy chemiczne, powstające poliketydy mogą stanowić substraty dla dalszych modyfikacji chemicznych [76]. Zastosowanie metod biosyntezy kombinatorycznej stanowi doskonałe dopełnienie zastosowania metod syntezy chemicznej dla otrzymywania nowych związków. Na drodze syntezy chemicznej wytwarzane są niedostępne w przyrodzie prekursorzy, które z kolei są wykorzystywane przez kompleks enzymatyczny syntazy. Wytwarza ona poliketyd, którego otrzymanie

przez modyfikację chemiczną naturalnego poliketydu byłyby skomplikowane i mało wydajne [77].

Aktywność biologiczna nowo uzyskanych poliketydów najczęściej nie jest opisywana w dostępnym piśmiennictwie naukowym. Informacje te zostają dopiero zawarte w opracowaniach patentowych otrzymywania nowych leków. Większość tych opracowań dostarczają duże przedsiębiorstwa farmaceutyczne: Roussel-Uclaf, Abbott Laboratories, Eli Lilly & Co. oraz Kosan Biosciences.

V. Podsumowanie

Opisane doświadczenia pokazują dynamiczny rozwój badań zmierzających do poznania struktury i organizacji zespołów genetycznych syntaz poliketydowych typu I oraz struktury kompleksów enzymatycznych tych syntaz. Badania te dostarczają informacji niezbędnych do poznania sposobu funkcjonowania syntaz poliketydowych typu I. Struktura przestrzenna kompleksu wieloenzymatycznego syntazy warunkuje to, że aktywność enzymatyczna domena każdego modułu jest niezależna od aktywności domeny modułów sąsiadujących w strukturze liniowej białka. Ta właściwość syntaz ma doniosłe znaczenie dla manipulacji genetycznych i oznacza, że unieczynnienie funkcji całego modułu lub jego zamiana na moduł pochodzący z innej syntazy nie mają wpływu na reakcje przeprowadzane przez moduł sąsiedni. Stwierdzono, że kolejność domen enzymatycznych wchodzących w skład modułów katalizujących kolejne cykle biosyntezy odpowiada strukturze chemicznej powstającego poliketydu. Nasunęło to pomysł, że można wprowadzić zaplanowane zmiany w procesie biosyntezy poprzez ingerencję genetyczną w strukturę modułu. Geny zarówno znanych, jak i nowych, często tylko częściowo scharakteryzowanych syntaz, posłużyły jako składniki do otrzymania mozaikowych zespołów genów wytwarzających produkty poliketydowe o zmienionej strukturze chemicznej. Posłużono się również układem biosyntezy poliketydów *in vitro* oraz zastosowano zmodyfikowane prekursorzy biosyntezy, które są przetwarzane przez układ enzymatyczny syntazy. Doświadczenia te doprowadziły do otrzymania wielu nowych związków poliketydowych, które mogą stanowić leki lub ich prekursorzy. Zastosowanie opisanych metod biotechnologicznych wciąż nie wyczerpuje potencjału kombinatorycznego syntaz poliketydowych typu I. Jego wykorzystanie w praktyce uzależnione jest zarówno od aktywności enzymatycznej i specyficzności substratowej poszczególnych domen kompleksu wieloenzymatycznego syn-

tazy jak od rozwoju nowych technik i strategii biotechnologii kombinatorycznej.

Podziękowania

Praca wykonana w ramach działalności statutowej Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej, przy wsparciu Komitetu Badań Naukowych. KBN 6P04B 025 16.

Artykuł otrzymano 23 listopada 1998 r.

Zaakceptowano do druku 5 sierpnia 1999 r.

Piśmiennictwo

1. Fuchser J, Thiericke R, Zeeck A (1995) *J Chem Soc Perkin Trans 1*: 1663-1666
2. Hopwood DA, Sherman DH (1990) *Annu Rev Genet* **24**: 37-66
3. Kuczek K, Kotowska M, Mordarski M (1996) *Post Bioch* **42**:276-283
4. Woloshuk CP, Prieto R (1998) *FEMS Microbiol Lett* **160**:169-176
5. Blanco G, Brian P, Pereda A, Méndez C, Salas JA, Chater KF (1993) *Gene* **130**:107-116
6. Blanco G, Pereda A, Brian P, Méndez C, Chater KF, Salas JA (1993) *J Bacteriol* **175**: 8043-8048
7. Blanco G, Pereda A, Méndez C, Salas JA (1992) *Gene* **112**: 59-65
8. Katz L, Donadio S (1993) *Annu Rev Microbiol* **47**: 875-912
9. Kelemen GH, Brian P, Flårdh K, Chamberlin L, Chater KF, Buttner MJ (1998) *J Bacteriol* **180**: 2515-2521
10. Hutchinson CR, Fujii I (1995) *Annu Rev Microbiol* **49**: 201-238
11. Kennedy J, Auclair K, Kendrews G, Park C, Venderas JC, Hutchinson CR (1999) *Science* **284**: 1368-1372
12. Child ChJ, Spencer JB, Bhogal P, Shoolingin-Jordan PM (1996) *Biochemistry* **35**: 12267-12274
13. Shen B, Hutchinson CR (1993) *Biochemistry* **32**: 11149-11154
14. Townsend CA (1997) *Chem Biol* **4**: 721-730
15. Cupp-Vickery JR, Poulos TL (1995) *Nat Struct Biol* **2**: 144-153
16. Lambalot RH, Cane DE, Aparicio JJ, Katz L (1995) *Biochemistry* **34**:1858-1866
17. O'Keefe DP, Harder PA (1991) *Mol Microbiol* **5**: 2099-2105
18. Stassi D, Donadio S, Staver MJ, Katz L (1993) *J Bacteriol* **175**: 182-189
19. Summers RG, Donadio S, Staver MJ, Wendt-Pienkowski E, Hutchinson CR, Katz L (1992) *J Bacteriol* **174**: 1810-1820
20. Smith S (1994) *The FASEB Journal* **8**: 1248-1259
21. Wakil SJ (1989) *Biochemistry* **28**: 4523-4530
22. Witkowski A, Rangan VS, Randhava ZI, Amy CM, Smith S (1991) *Eur J Biochem* **198**: 571-579
23. Zhang Y, Cronan JE (JR) (1996) *J Bacteriol* **178**:3614-3620
24. Hopwood, DA (1997) *Chem Rev* **97**: 2465-2497
25. Bevitt DJ, Cortes J, Haydock SF, Laedlay PF (1992) *Eur J Biochem* **204**: 39-49
26. Vilches C, Hernandez C, Mendez C, Salas JA (1992) *J Bacteriol* **174**: 161-165
27. Richardson MA, Khustoss S, Huber MLB, Ford L, Godfrey O, Turner JR, Rao RN (1990) *J Bacteriol* **172**: 3790-3798
28. Merson-Daves LA, Cundliffe E (1994) *Mol Microbiol* **13**: 349-355

29. Tang L, Yoon YJ, Choi CY, Hutchinson CR (1998) *Gene* **216**: 255-265
30. August PR, TANG L, Yoon YJ, Ning S, Miller R, Yu TW, Taylor M, Hoffmann D, Kim CG, Zhang X, Hutchinson CR, Floss HG (1998) *Chem Biol* **5**: 69-79
31. Aparicio JF, Molnar I, Schwecke T, Knig A, Haydock SF, Khaw LE, Staunton J, Leadlay PF (1996) *Gene* **169**: 9-16
32. Motamedi H, Cai S-J, Shafiee A, Elliston KO (1997) *Eur J Biochem* **244**: 74-80
33. Motamedi H, Shafiee A (1998) *Eur J Biochem* **256**: 528-534
34. MacNeil DJ, Occi JL, Gewain KM, MacNeil T, Gibbons PH (1992) *Gene* **115**: 119-125
35. Jordan PM, Spencer JB (1993) *Biochem Soc Trans* **21**: 222-228
36. Beck J, Ripka S, Siegner A, Schiltz E (1990) *Eur J Biochem* **192**: 487-498
37. Spencer JB, Jordan PM (1992) *Biochem J* **288**: 839-846
38. Caffrey P, Green B, Packman L, Rawlings BJ, Staunton J, Leadlay PF (1991) *Eur J Biochem* **195**: 823-830
39. Kao CM, Pieper R, Cane DE, Khosla Ch (1996) *Biochemistry* **35**: 12363-12368
40. Aparicio JF, Caffrey P, Marsden AFA, Staunton J, Leadlay PF (1994) *J Biol Chem* **269**: 8524-8528
41. Staunton J, Caffrey P, Aparicio JF, Roberts GA, Bethell SS, Leadlay PF (1996) *Nat Struct Biol* **3**: 188-192
42. Pieper R, Luo G, Cane DE, Khosla Ch (1995) *J Am Chem Soc* **117**: 11373-11374
43. Cortes J, Wiesman KEH, Roberts GA, Brown MJB, Staunton J, Leadlay PF (1995) *Science* **268**: 1487-1489
44. Jacobsen JR, Hutchinson CR, Cane DE, Khosla Ch (1997) *Science* **277**: 367-369
45. Marsden AFA, Caffrey P, Aparicio JF, Loughran MS, Staunton J, Leadlay PF (1994) *Science* **263**: 378-380
46. Dhillon N, Hale RS, Cortes J, Leadlay PF (1989) *Mol Microbiol* **3**: 1405-1414
47. Wiessman KJ, Timoney M, Bycroft M, Grice P, Hanefeld U, Staunton J, Leadlay PF (1997) *Biochemistry* **36**: 13849-13855
48. Carreras CW, Santi DV (1998) *Curr Opin Biotechnol* **9**: 403-411
49. Kao CM, Katz L, Khosla Ch (1994) *Science* **265**: 509-412
50. Lin CY, Smith S (1978) *J Biol Chem* **253**: 1954-1963
51. Donadio S, Staver MJ, McAlpine JB, Swanson SJ, Katz L (1992) *Gene* **115**: 97-103
52. Donadio S, Staver MJ, McAlpine JB, Swanson SJ, Katz L (1991) *Science* **252**: 675-679
53. MacNeil DJ, Occi JL, Gewain KM, MacNeil T, Gibbons PH, Ruby CL, Danis SJ (1992) *Gene* **115**: 119-125
54. Meuer G, Hutchinson CR (1995) *J Bacteriol* **177**: 477-481
55. Ruan X, Pereda A, Stassi DL, Zeidner D, Summers RG, Jackson M, Shivakumar A, Kakavas S, Stave MJ, Donadio S, Katz L (1997) *J Bacteriol* **179**: 6416-6425
56. Schwecke T, Aparicio JF, Molnr I, Knig A, Khaw LE, Haydock SF, Oliynyk M, Caffrey P, Cortes J, Lester LB, Bhm GA, Staunton J, Leadlay PF (1995) *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 7839-7843
57. Hrubby VJ, Ahn J-M, Liao S (1997) *Curr Opin Chem Biol* **1**: 114-119
58. Pan T (1997) *Curr Opin Chem Biol* **1**: 17-25
59. Tietze LF, Lieb ME (1998) *Curr Opin Chem Biol* **2**: 363-371
60. Hutchinson CR (1998) *Curr Opin Microbiol* **1**: 319-329
61. Stachelhaus T, Schneider A, Marahiel MA (1995) *Science* **269**: 69-72
62. Leadlay PF (1997) *Curr Opin Chem Biol* **1**: 162-168
63. Pieper R, Ebert-Khosla S, Cane D, Khosla Ch (1996) *Biochemistry* **35**: 2054-2060
64. Pieper R, Gokhale RS, Luo G, Cane DE, Khosla Ch (1997) *Biochemistry* **36**: 1846-1851
65. Kao CM, Luo GL, Katz L, Cane DE, Khosla Ch (1995) *J Am Chem Soc* **117**: 9105-9106
65. Bedford D, Jacobsen JR, Luo G, Cane DE, Khosla C (1996) *Chem Biol* **3**: 827-831
67. Khustoss S, Huber M, Turner JR, Paschal JW, Rao RN (1996) *Gene* **183**: 231-236
68. Luo G, Pieper R, Rosa A, Khosla Ch, Cane DE (1996) *Bioorgan Med Chem* **4**: 3800-3811
69. Hafner EW, Holley BW, Koldom KS, Lee SE, Wax RG, Beck D, McArthur HAI, Wernau WC (1991) *J Antibiot* **44**: 349-356
70. Ikeda H, Omura S (1995) *J Antibiot* **48**: 549-562
71. Marsden AFA, Wilkinson B, Cortes J, Dunster NJ, Staunton J, Leadlay PF (1998) *Science* **279**: 191-202
72. Haydock SF, Aparicio JF, Molnr I, Schwecke T, Khaw LE, Knig A, Marsden AFA, Galloway IS, Staunton J, Leadlay PF (1995) *FEBS Lett* **374**: 246-248
73. Kuczek K, Pawlik K, Kotowska M, Mordarski M (1997) *FEMS Microbiol Lett* **157**: 195-200
74. Oliynyk M, Brown MJB, Cortes J, Staunton J, Leadlay PF (1996) *Chem Biol* **3**: 833-839
75. Cane DE, Luo G (1995) *J Am Chem Soc* **117**: 6633-6634
76. Griesgraber G, Or YS, Chu DT, Nilus AM, Johnson PM, Flamm RK, Henry RF, Plattner JJ (1996) *J Antibiot* **49**: 465-477
77. Cane DE, Walsh CT, Khosla C (1998) *Science* **282**: 63-68

Zjawisko indukowanej fluorescencji chlorofilu jako źródło informacji o procesach fotosyntezy zachodzącej w roślinach i stanie środowiska

Induced chlorophyll fluorescence as a source of information on photosynthesis in plants and environment conditions

ANDRZEJ JANKOWSKI*

Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Związek krzywej indukcji z fotosyntetycznym transportem elektronów
 - II-1. Wpływ reakcji fotochemicznej na fluorescencję
 - II-2. Wyjaśnienie mechanizmu wpływu fotosyntezy na fluorescencję
 - II-3. Interpretacja krzywych indukcji przy oświetleniu ciągłym
- III. Tłumienie fluorescencji chlorofilu w organizmach fotosyntetyzujących
 - III-1. Czynniki tłumienia fluorescencji chlorofilu w roślinach
 - III-2. Badanie składników tłumienia metodą fluorescencji impulsowej
 - III-3. Badanie wpływu inhibitorów fotosyntezy na składniki tłumienia indukowanej fluorescencji chlorofilu
- IV. Przykłady zastosowań pomiarów fluorescencji chlorofilu
- V. Zastosowanie metod luminescencyjnych do badania stanu roślin i stresu

Wykaz używanych skrótów: PSI, PSII — fotosystem I, fotosystem II; Q_A, Q_B — plastochinon A, plastochinon B; RC — centrum reakcji fotochemicznej; SCh — specjalna grupa chlorofilu w RC.

I. Wstęp

Chlorofil jest jednym z barwników roślinnych uczestniczących w procesie recepcji energii światła i

*Dr hab., Wyższa Szkoła Pedagogiczna im. T. Kotarbińskiego, Instytut Biotechnologii i Ochrony Środowiska, 65-561 Zielona Góra ul. Monte Cassino 21b; Uniwersytet Wrocławski, Wydział Chemii, ul. F. Joliot-Curie 14, 50-383 Wrocław

Contents:

- I. Introduction
- II. Interrelation between fluorescence induction curve and photosynthetic electron transport
 - II-1. Influence of photochemical reaction on the fluorescence intensity
 - II-2. Explanation of the influence of photosynthesis on the fluorescence
 - II-3. Interpretation of the induction curves at constant illumination of samples
- III. Quenching of the chlorophyll fluorescence in photosynthesizing organisms
 - III-1. Components of chlorophyll fluorescence quenching in plants
 - III-2. Determination of components of quenching by fluorescence impulse methods
 - III-3. Investigation of the influence of inhibitors of photosynthesis on fluorescence quenching components
- IV. Application of the measurements of chlorophyll fluorescence to the study of photosynthesis
- V. Application of luminescence methods to the investigation of the physiological status of plants

przekształceniu jej w energię swobodną reakcji chemicznej fotosyntezy.

Zakres absorpcji wszystkich barwników fotosyntetycznych obejmuje niemal całe widmo widzialnego światła słonecznego; jednak przy długości fali powyżej 650 nm absorpcję wykazuje praktycznie jedynie chlorofil. Jeżeli więc będziemy wzbudzać próbkę światłem o długości fali większej niż 650 nm, to możemy uzyskać czyste widmo fotoluminescencji chlorofilu zawartego w roślinie.

Fluorescencja chlorofilu w organizmie fotosyntetyzującym charakteryzuje się dwoma pasmami emisji z maksimami przy około 690 i 735 nm — dokładne położenie maksimów pasm jest zależne od

stanu organizmu [1, 2]. Widmo fluorescencji chlorofilu A w roztworze acetonowym wykazuje również dwa pasma emisji z maksimami przy 695 i 710 nm [3]. Występowanie dwu pasm emisji dla roztworu czystej substancji organicznej jest zjawiskiem raczej wyjątkowym; w danym wypadku można je tłumaczyć istnieniem dimerów/oligomerów w stanie podstawowym lub wzbudzonym [4, 5]. Dla chlorofilów a,b,c,d,e zawartych w roślinie widma absorpcji i luminescencji są zmienione a intensywność obniżona względem odpowiednich widm czystych substancji w roztworze [6, 7]. Jest to wywołane głównie oddziaływaniem orbitali molekularnych [8] cząsteczek położonych blisko siebie, przy ich określonym uporządkowaniu związanym z ich rolą w aparacie fotosyntetycznym.

Intensywność fluorescencji chlorofilu zawartego w komórkach, jaką możemy rejestrować przy pomocy odpowiedniej aparatury, zależy od oddziaływania elektronowego między cząsteczkami a także od czynników aparaturowych, jak efekt filtru wewnętrznego i reabsorpcja promieniowania emitowanego [4, 5]. Zjawisko reabsorpcji promieniowania polega na tym, że jeżeli pasmo absorpcji nakrywa się częściowo z pasmem emisji, to promieniowanie wyemitowane przez jedną cząsteczkę może być zaabsorbowane przez sąsiednią molekułę i zamienione na inny rodzaj energii. Światło fluorescencji emitowane w ramach pasma z maksimum 690 nm jest silnie reabsorbowane przez cząsteczki chlorofilu niż światło emitowane w pasmie 735 nm. Stąd wzrost stężenia chlorofilu w komórkach powoduje narastanie intensywności pasma 735 nm względem pasma 690 nm [3, 9]. Stosunek intensywności tych pasm jest więc używany jako wskaźnik zawartości chlorofilu w roślinie. Pomiaru takie znajdują obszernie zastosowanie w praktyce (zob. niżej rozdz. V).

Z punktu widzenia obecnej tematyki najbardziej interesująca jest zależność intensywności fluorescencji chlorofilu od funkcjonowania aparatu fotosyntetycznego. Intensywność fluorescencji w nieobecności wspomnianych wyżej artefaktów aparaturowych powinna rosnać proporcjonalnie do stężenia chlorofilu. Wydajność kwantowa fluorescencji dana wzorem (1) będzie w tych warunkach wartością stałą.

$$\Phi_F = NF/NA = k_f/(k_f + k_n + k_p) \quad (1)$$

gdzie NF, NA oznaczają odpowiednio ilość kwantów światła wyemitowanych w postaci fluorescencji i zaabsorbowanych, zaś k_f , k_n , k_p — są stałymi szybkości odpowiednio emitowania fluorescencji, konkurujących z fluorescencją w stanie wzbudzonym cząsteczki procesów bezpromienistych i reakcji foto-

chemicznej. Wzór (1) wskazuje, że wydajność kwantowa fluorescencji, a więc i jej intensywność, jest odwrotnie proporcjonalna do szybkości reakcji chemicznej fotosyntezy. Wydajność kwantowa fluorescencji chlorofilu w roztworze alkoholowym $\Phi_F = 0.3$, podczas gdy dla chlorofilu zawartego w roślinie w nieobecności fotosyntezy $\Phi_F = 0.03$, a w obecności fotosyntezy $\Phi_F = 0.006$ [5]. Widać stąd, że otoczenie chlorofilu w organizmie żywym daje gaszenie fluorescencji a ponadto fotosynteza powoduje dalsze obniżenie intensywności.

W latach 20 obecnego wieku H. Kautsky [10] zauważył, że jeśli roślinę umieszczoną w ciemności poddamy działaniu światła widzialnego o niezbyt dużej intensywności, to zaobserwujemy początkowo słabą fluorescencję chlorofilu (F_0) która szybko narasta do pewnej wartości maksymalnej (F_M). Po pewnym czasie intensywność fluorescencji wykazuje powolny spadek, po czym po kilkunastu minutach przyjmuje wartość stałą (F_s) zbliżoną do wartości początkowej. Aby zrozumieć opisany przebieg zmian fluorescencji w czasie — który w dalszym ciągu będzie określany jako krzywa indukcji — należy wziąć pod uwagę przebieg zdarzeń jaki ma miejsce w komórkach roślinnych po zaabsorbowaniu kwantów światła.

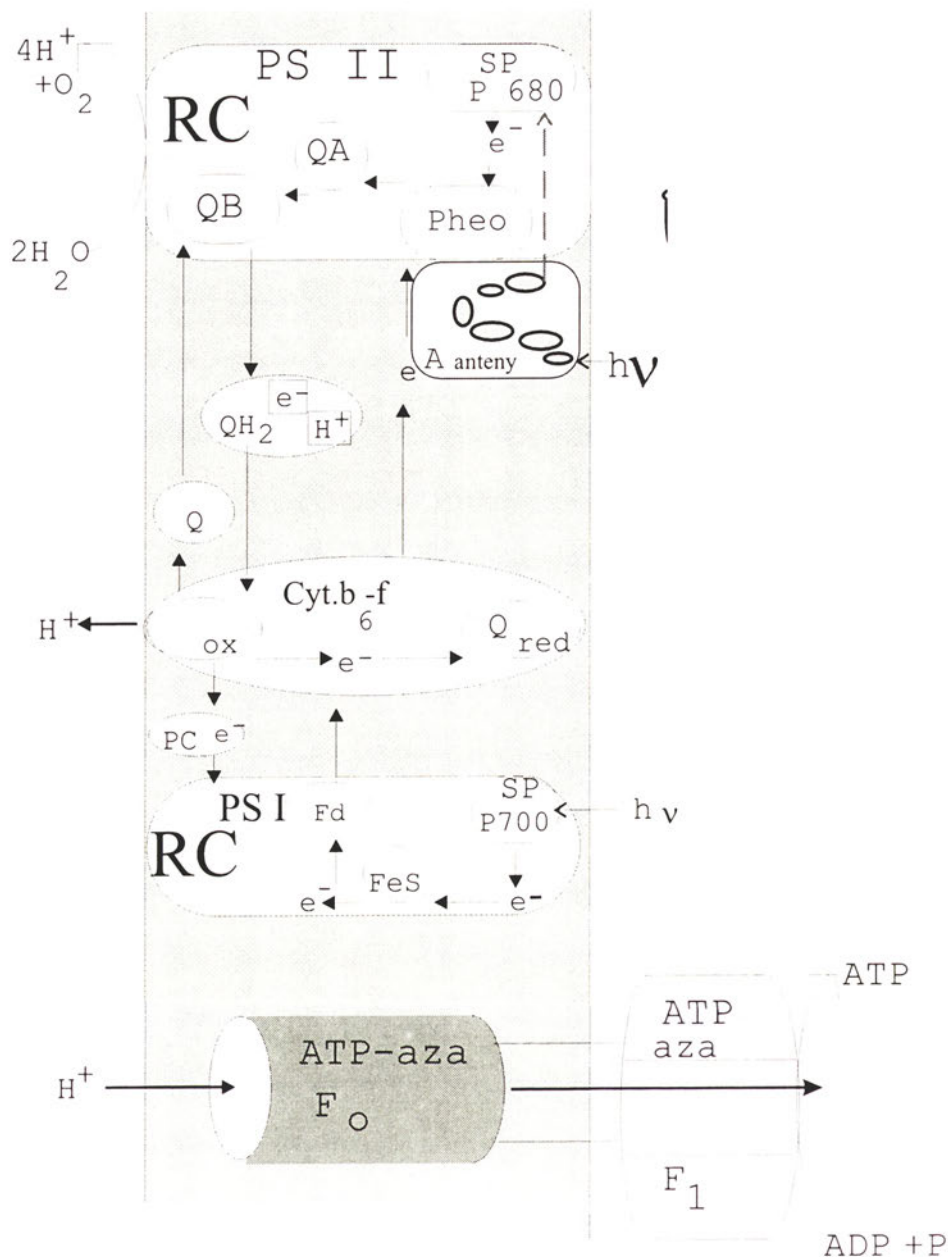
II. Związek krzywej indukcji z fotosyntetycznym transportem elektronów

Cząsteczki chlorofilu wchodzą w skład błon tylakoidów (Ryc. 1) co powoduje specyficzne ich uporządkowanie w ramach fotosystemów I i II (PSI i PSII).

Tylko niewielka ilość chlorofilu uczestniczy bezpośrednio w reakcji fotochemicznej w centrach reakcji (RC). Pozostałe cząsteczki są zawarte w polipeptydowych kompleksach antenowych, których rola polega na wychwytywaniu energii świetlnej i doprowadzeniu jej — na zasadzie bezpromienistej migracji energii — do RC. Szybkość bezpromienistego przekazywania energii w obrębie kompleksów antenowych jest zależna od własności spektralnych barwników, kąta wzajemnego ustawienia momentów ich przejść elektronowych i odległości międzycząsteczkowej.

II-1. Wpływ reakcji fotochemicznej na fluorescencję

Ponieważ ponad 90 % energii absorbowanej przez anteny jest zużywane do inicjowania reakcji fotochemicznej, fluorescencja chlorofilu wyrażona na krzywej indukcji przez wartość F_0 , w czasie działania



Ryc. 1. Transport elektronów i protonów w błonie tylakoidu. a) chloroplast, b) błona tylakoidu w powiększeniu.

aparatu fotosyntetycznego, jest bardzo słaba. Gdy kwant światła o częstotliwości rezonansowej dotrze do RC, zostaje on pochłonięty przez występującą tu „specjalną” molekułę chlorofilu (SCh) związaną z polipeptydami D₁ i D₂ tworząc strukturę wystającą ponad błonę tylakoidu. SCh ulega reakcji fotochemicznej, polegającej na uwolnieniu elektronu i przekazaniu go cząsteczce feofityny (Ryc. 1 — Pheo, analog chlorofilu pozbawiony jonu metalu) [11, 12]. SCh zawdzięcza swoją „specjalną” zdolność do trwałej separacji ładunków właściwościom fizykochemicznym otoczenia i swej strukturze dimerycznej, zbliżonej prawdopodobnie do struktury występującej w centrum reakcji bakterii fotosyntetyzujących.

W następnym etapie elektron jest przenoszony na cząsteczkę plastochinonu (Q_A) w podjednostce D₂. Przeniesienie elektronu z Pheo na Q_A jest warunkiem stabilizacji produktu reakcji fotochemicznej (SCh⁺, E⁻). Redukcja Q_A powoduje zablokowanie RC gdyż przy ujemnym ładunku Q_A nie jest możliwe ponowne uwolnienie elektronu z znajdującej się w niewielkiej odległości grupy SCh [5, 13-15].

W tej sytuacji dalsze kwanty energii przenoszone z anten (A) nie są zużywane w RC na inicjowanie reakcji fotochemicznej, lecz mogą powrócić do anten i ulegać przekształceniu w fluorescencję. Wyraża się to na krzywej indukcji jako wzrost intensywności fluorescencji od wartości F₀ do wartości maksymalnej (F_M). Produktem redukcji jest semichinon Q_A

(anionorodnik) będący niestabilną formą krótkożyjącą. Następuje więc transport elektronu do drugiej cząsteczki plastochinonu (Q_B) umieszczonej dalej od SCh, w podjednostce D_1 zbudowanego według reguł podwójnej symetrii (C_{2v}) kompleksu transbłonowego tworzącego PSII (Ryc. 1). Powrót Q_A do obojętnej elektrycznie formy chinonowej powoduje odblokowanie RC, a możliwość przyjęcia nowych porcji energii (ekscytonów) z anten do SCh pociąga za sobą spadek intensywności fluorescencji widoczny na krzywej indukcji. Jednak ze względu na to, że szybkość przeniesienia elektronu z $Q_A \rightarrow Q_B$ i dalej na $NADP^+$ jest dużo niższa niż w poprzednich etapach transportu elektronu z SCh do Q_A (10^{-11} s) [13, 16], swobodny transfer energii z anten do RC jest uzależniony od szybkości dalszych procesów transferu elektronu z Q_B do $NADP^+$, które muszą więc być krótko omówione.

Cząsteczka plastochinonu Q_B , znajdująca się w odmiennym otoczeniu niż Q_A , ulega redukcji do trwałej formy aromatycznej hydrochinonu przez pobranie drugiego elektronu i dwóch protonów. Na tym etapie następuje połączenie transportu elektronów i protonów. Cząsteczka Q_B zawierająca nowo przyłączony elektron i proton jest bowiem dalej transportowana do kompleksu cytochromowego (Cyt b-f, Ryc. 1). Stąd elektron przenosi się do PSI i jest dalej wykorzystywany do redukcji $NADP^+$, co jest niezbędne do asymilacji CO_2 . Proton jest przenoszony na drugą stronę (wewnętrzną) błony tylakoidu wbrew gradientowi stężenia, co daje tworzenie gradientu protonów wykorzystywanego do syntezy ATP lub do transportu innych jonów potrzebnych do rozwoju organizmu. Przenoszenie elektronów z $Q_A \rightarrow Q_B$ jest hamowane na skutek zależności od wymienionych ostatnio dalszych etapów transportu elektronów i protonów. Powoduje to zmniejszenie szybkości otwierania RC i zatem spadku intensywności fluorescencji na krzywej indukcji po przejściu przez maksimum (F_M). Po odpowiednio długim okresie czasu intensywność fluorescencji powinna spaść do poziomu początkowego (F_0). Ze względu na współzależność etapów fotosyntetycznego transportu elektronów, nawet po długim czasie obserwacji nie ma pewności, że poziom F_0 został już osiągnięty. Poziom sygnału, jaki otrzymuje się po długim czasie obserwacji (10-15 minut) określa się jako F_s . Do wyznaczenia wartości F_0 potrzebny jest pomiar natężenia fluorescencji bezpośrednio po włączeniu światła, co jest trudne do realizacji z powodu szybkiego narastania sygnału w czasie rzędu μ s.

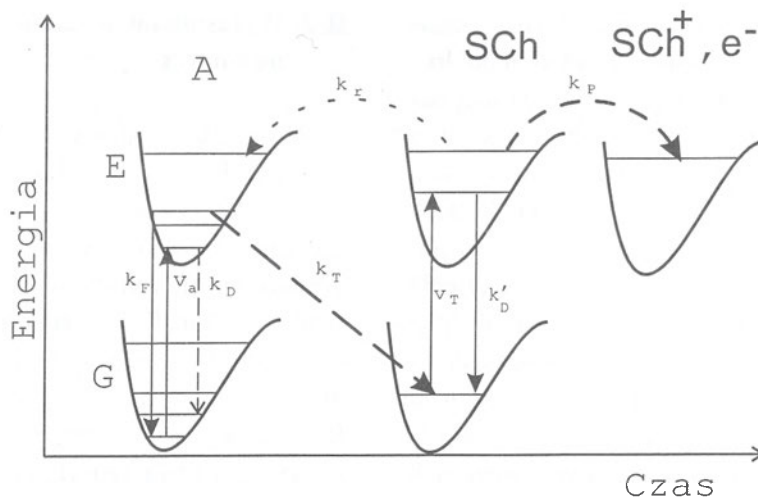
II-2. Wyjaśnienie mechanizmu wpływu fotosyntezy na fluorescencję

W świetle opisanych zjawisk przebieg krzywych indukcji fluorescencji mogłyby być wyjaśnione przyjmując, że obserwowany sygnał pochodzi z fluorescencji chlorofilu zawartego w antenach lub w RC. Według opinii wyrażonej w pracach [17, 18] fluorescencja chlorofilu w roślinach pochodziłaby z rekombinacji ładunków (SCh^+, E^-) w RC. Pomiary zaniku stanu wzbudzonego chlorofilu w izolowanych RC i identyczność parametrów fluorescencji otrzymanej przy otwartym (F_0) i zamkniętym RC (F_M) [9, 11] przemawiają zdecydowanie za wnioskiem, że szybka fluorescencja chlorofilu w roślinach pochodzi z anten a rekombinacja ładunków w RC może wiązać się z słabą opóźnioną luminescencją (LDL).

Procesy zachodzące w antenach i RC po absorpcji światła są zobrazowane na ryc. 2, gdzie zakłada się, że fluorescencja chlorofilu w roślinach pochodzi głównie z anten, a rekombinacja ładunków w RC może wiązać się z słabą opóźnioną luminescencją (LDL) [19-23]. Schemat ten (Ryc. 2) przedstawia krzywe potencjalne cząsteczki SCh znajdującej się w RC w stanie podstawowym (G) i wzbudzonym (E), z zaznaczonym niektórymi poziomami oscylacyjnymi. Strzałki oznaczają przejścia między stanami G, E cechujące się szybkościami k_F , k_D , k_T , k_P (znaczenie symboli podano w objaśnieniach do schematu). Konkurencja między tymi procesami decyduje o intensywności fluorescencji i efektywności reakcji fotochemicznej.

Dawniej przyjmowano [24, 25], że $k_1 \ll k_P$ i że czynnikiem ograniczającym szybkość reakcji fotochemicznej jest migracja wzbudzenia z anten do RC (k_T). Późniejsze badania wykazały jednak, że szybkość migracji wzbudzenia (ekscytonu) jest znacznie większa niż szybkość separacji ładunków (k_P) [26] tak, że proces pobierania energii przy otwartych RC przebiega w warunkach równowagi między k_T i k_T (Ryc. 2). Wskutek tego przy dużych wartościach k_T i k_T mierzony czas życia stanu wzbudzonego chlorofilu w tkance jest stosunkowo krótki (niższy niż 10^{-9} s) [26].

Opierając się na przedstawionej interpretacji krzywych indukcji i na schemacie pokazanym na Ryc. 2, można udowodnić, przy paru upraszczających założeniach (zob objaśnienia do Ryc. 2), że wydajność kwantowa reakcji fotochemicznej (F_P) może być obliczona łatwo z krzywych indukcji [9, 11, 24, 25].



Ryc. 2. Przebieg reakcji w RC po przekazaniu kwantu energii z (A) A — anteny, Sch — specjalna grupa cząsteczek chlorofilu. k_F , v_a , k_D , k_T — stałe szybkości procesów dotyczących anteny (A) fluorescencji, absorpcji światła, dezaktywacji bezpromienistej, transferu energii do RC, k_P , k_T , v_T i k'_D — stałe szybkości procesów dotyczących wzbudzonego centrum reakcji (Sch) reakcji fotochemicznej, procesu powrotu energii wzbudzenia do A przy zamkniętym RC — absorpcji i dezaktywacji bezpromienistej odpowiednio. Pominięto tu możliwość zmiany spinu Sch w stanie wzbudzone i przejścia do postaci tripletowej. Można założyć, że maksimum fluorescencji otrzymuje się przy $F_F = k_F / (k_F + k_D + k_D')$ a minimum przy $\Phi_F = k_F / (k_F + k_D + k_D' + k_P + k_T)$.

$$\Phi_P = NR/NA = k_P / (k_F + k_n + k_P) = F_V / F_M = (F_M - F_0) / F_M \quad (2)$$

gdzie większość symboli ma znaczenie takie jak we wzorze (1) a NR — ilość kwantów światła zużytych na reakcję fotochemiczną. We wzorze (2) dla uproszczenia zastosowano inną symbolikę niż w ryc. 2. Wartości k_n i k_P występujące we wzorze (2) mogą być wyrażone następująco przez symbole schematu:

$$k_n = (k_D + k_D') \quad \text{ i } \quad k_P = (k_P + k_T)$$

Z wzoru (2) — po odpowiednich przekształceniach i uproszczeniach — można wyznaczyć stałą szybkości procesów bezpromienistych (k_n) co ma znaczenie w badaniu wpływu nadmiernego oświetlenia na fotosyntezę (zob. niżej — rozdz.IV). Możliwość zastosowania wzoru (2) do obliczenia wydajności kwantowej fotosyntezy (Φ_P) i wartości (k_n) jest powodem, że znaczny wysiłek został włożony w udoskonalenie pomiarów F_M i F_0 [9].

Równowaga stanów wzbudzonych (transferu energii) w kompleksach antenowych [9, 12, 26, 27] ustala się w czasie 1.5×10^{-11} s a pojedynczy akt przeniesienia elektronu z Sch na Q_A zachodzi w czasie rzędu 10^{-10} s [13, 26]. Przeniesienie elektronu z Q_A na Q_B w RC (PSII) przebiega dużo wolniej — w czasie rzędu 2×10^{-4} s. Gdyby więc redukcja Q_A i zamykanie RC przebiegało jednocześnie we wszystkich centrach, to należałoby się spodziewać, że fluorescencja będzie narastać w czasie 10^{-10} s po włączeniu światła a w rzeczywistości obserwuje się to po czasie rzędu 10^{-3} s. Opóźnienie to tłumaczy się współzależnością procesów przeniesienia elektronu z Sch na Q_A i z Q_A na Q_B oraz dalszych etapów fotosyntezy takie jak magazynowaniem energii w postaci ATP i wydzielania

nie tlenu [28, 29] (zob. rozdz.IV). Podsumowując, przebieg zmian intensywności fluorescencji po naświetleniu rośliny (krzywa indukcji) da się więc zadowalająco wyjaśnić przy pomocy aktualnej wiedzy o transporcie elektronów w tkankach fotosyntetyzujących.

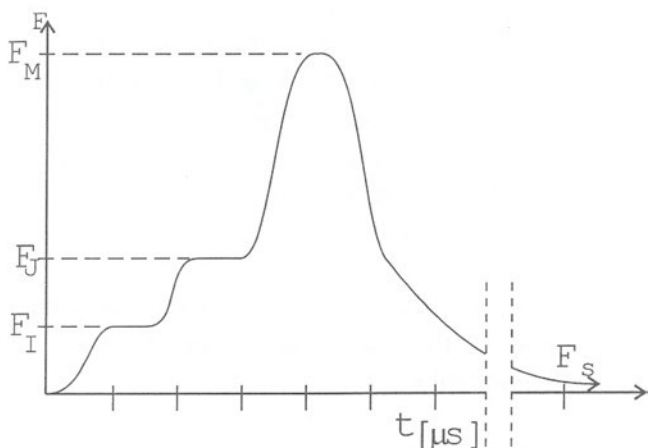
Ponadto za powiązaniem krzywych indukcji z etapami transportu elektronów przemawiają następujące fakty: **a)** obliczenia stałej szybkości reakcji fotochemicznej (k_P) z danych fluorymetrii stacjonarnej [24] dają wartość $1.95 \times 10^9 \text{ s}^{-1}$ co daje czas reakcji ($1/k_P$) zbliżony do czasu uzyskanego z pomiarów zaniku fluorescencji (zob wyżej) **b)** pomiary przy użyciu najnowszej aparatury wykazały, że efektywność fotosyntezy wyliczona z krzywych indukcji jest zgodna z danymi wymiany gazowej [30] choć w dawniejszych pracach spotkać można pewne niezgodności [28, 31] **c)** dodatek inhibitorów fotosyntezy powoduje wzrost intensywności na krzywej indukcji, co jest całkowicie zgodne z przewidywaniami opartymi na założeniu, że krzywe te są powiązane ściśle z fotosyntetycznym łańcuchem transportu elektronów. Do problematyki tej powrócimy poniżej w rozdziale III poświęconym tłumieniu fluorescencji. Obecnie bowiem należy przedstawić różne typy krzywych indukcji jakie otrzymuje się przy zastosowaniu rozmaitych warunków oświetlenia i detekcji.

II-3. Interpretacja krzywych indukcji przy oświetleniu ciągłym

Oświetlenie tkanki roślinnej pojedynczym impulsem daje monotoniczny wzrost fluorescencji do war-

tości F_M która po pewnym czasie ulega obniżeniu do stałej wartości F_s . Wzbudzenie próbki ciągłym światłem widzialnym o niezbyt dużej intensywności daje bardziej skomplikowaną krzywą [9, 28, 32] typu przedstawionego schematycznie na rycinie 3.

Wzrost intensywności od wartości F_0 do F_M ma w tych warunkach przebieg dwuetapowy. Pierwsze przegięcie prowadzi do plateau F_1 i wiąże się z przeniesieniem elektronu na Q_A [9, 13]. Poziom sygnału F_1 (Ryc. 3) odpowiada ilości centrów RC, o obniżonej aktywności spowodowanej zahamowaniem transportu elektronu z Q_A do Q_B . Przyczyną jest utrudnienie dostępu do miejsca wiążącego Q_B [9, 33-38] w niektórych układach RC.



Ryc. 3. Schematyczna krzywa indukcji fluorescencji przy oświetleniu ciągłym.

Interpretacja drugiego przegięcia krzywej indukcji dającego poziom F_2 jest mniej pewna lecz najczęściej jest ono związane z gaszeniem fluorescencji chlorofilu w antenach przez RC w stanie utlenionym [9]. Przebieg krzywej na ryc. 3 jest zależny od natężenia światła wzbudzającego — przy silnym świetle pobudzającym przegięcia F_1 i F_2 ulegają zatarciu. Przy zmienionych warunkach eksperymentalnych otrzymuje się inny przebieg zmian fluorescencji przy oświetleniu ciągłym [28] niż przedstawiony na rycinie 3. Kształt krzywej indukcji otrzymanej w identycznych warunkach eksperymentu jest zależny od stanu tkanki fotosyntetyzującej — np. stwierdza się znaczne różnice w przebiegu krzywej dla liści żółtych, opadających i dla zdrowych liści zielonych. Istnieje więc możliwość zastosowania pomiarów fluorescencji przy oświetleniu ciągłym do przyżyciowych badań fizjologicznych [32] ze względu na możliwość użycia przenośnej aparatury działającej w świetle słonecznym.

III. Tłumienie fluorescencji chlorofilu w organizmach fotosyntetyzujących

Jak wspomniano wyżej wydajność kwantowa fluorescencji chlorofilu w roślinach jest wielokrotnie niższa od odpowiedniej wartości dla chlorofilu w roztworze. Konkurencja między różnymi procesami dezaktywacji wzbudzonych cząsteczek chlorofilu powoduje obniżenie wydajności kwantowej fluorescencji (wzór (1)).

III-1. Czynniki tłumienia fluorescencji chlorofilu w roślinach

Przyczyną obniżenia intensywności świecenia może być wykorzystanie części energii zaabsorbowanej na reakcję chemiczną fotosyntezy (wzór (1) — k_p) lub na inne procesy związane z fotosyntezą powodujące zwiększenie wartości k_n we wzorze (1). W pierwszym przypadku mówimy o fotochemicznym tłumieniu fluorescencji (q_p) a w drugim o tłumieniu niefotochemicznym (q_n).

Na tłumienie niefotochemiczne składa się szereg procesów z których trzy najważniejsze to: 1) tłumienie zależne od energii chemicznej nagromadzonej w układzie q_E , związane z tworzeniem gradientu jonów wodorowych na błonie tylakoidu [9, 39, 40]. Efekt ten jest przypisywany obniżeniu pH wewnątrz (lumen tylakoidu) i podwyższeniu pH na zewnątrz (stroma chloroplastu) co prowadzi do przegrupowania cząsteczek chlorofilu i zwiększenia szybkości procesów bezpromienistych (k_n — wzór (1)) 2) tłumienie związane z przejściem fazowym w chloroplastach q_T — spowodowane fosforylacją białek w kompleksach antenowych co warunkuje zmianę struktury gran i lamelli [9, 40] powodującą zwiększenie odległości między antenami a RC, co prowadzi do zmniejszenia prawdopodobieństwa transferu energii między tymi elementami (zmniejszenie k_r i k_T — zob. ryc. 2) 3) tłumienie fotoinhibitorowe q_I będące naturalnym mechanizmem adaptacji roślin do szkodliwego dla organizmu, nadmiernego oświetlenia, polegającym na katalizowanej enzymatycznie deepoksydacji wiolaksantyny i tworzeniu zeaksantyny, która może pośredniczyć w przekształceniu nadmiaru energii świetlnej na ciepło [13, 41]. Procesy 1-3 wykazują współzależność i mogą zachodzić na siebie — tak, że separacja ich — a szczególnie q_E jest trudna. Najistotniejsze jest rozróżnienie tłumienia fotochemicznego q_p od niefotochemicznego q_n . Efekty te mogą być odseparowane przy zastosowaniu zaawansowanej aparatury, dającej możliwość

użycia do pomiarów światła o różnej intensywności i częstotliwości w tym silnych impulsów wysycających, które powodują zamykanie wszystkich RC. Krzywe indukcji mogą być badane przy oświetleniu ciągłym światłem o długości fali 660 nm. Zaletą takiej metodyki jest możliwość użycia lekkiej przenośnej aparatury. Można uzyskać w ten sposób krzywe analogiczne do przedstawionej na rycinie 3, które mogą przyczynić się pośrednio do oceny składników tłumienia.

III-2. Badanie składników tłumienia metodą fluorescencji impulsowej

W handlu są dostępne fluorymetry impulsowe [30, 41-45] z modulacją amplitudy, specjalnie skonstruowane do badania krzywych indukcji fluorescencji chlorofilu i oznaczania składników tłumienia tej fluorescencji. Aparaty te pozwalają na pomiar intensywności fluorescencji jako sygnału modulowanego o określonej częstotliwości, nawet w obecności silnego oświetlenia ciągłego (do 10^6 razy silniejszego od sygnału) [42] lecz nie umożliwiają śledzenia etapów narastania fluorescencji widocznych na rycinie 3. Oznaczenie składowych tłumienia q_P i q_N na aparacie impulsowym wymaga zastosowania trzech rodzajów źródła światła (Ryc. 4):

1) światło ciągłe pobudzające fotosyntezę lecz nie dające zamykania RC ($150-200 \mu E m^{-2} s^{-1}$)

2) światło modulowane nie pobudzające fotosyntezy ($5-10 \mu E m^{-2} s^{-1}$, $\lambda > 650 nm$) lecz wzbudzające selektywnie fluorescencję chlorofilu

3) wysycający błysk światła powodujący zamykanie wszystkich RC ($>2700 \mu E m^{-2} s^{-1}$).

Gdy impuls wysycający pada na roślinę umieszczoną w ciemności otrzymuje się w efekcie maksymalny wzrost fluorescencji charakteryzujący się wysoką wartością F_M i $F_V = (F_M - F_0)$ [43-45]. Wysokie wartości F_M i F_V są wywołane brakiem tłumienia fotochemicznego — gdyż zamknięcie RC uniemożliwia przebieg reakcji rozdzielenia ładunków (Ryc. 2) — a także brakiem tłumienia niefotochemicznego — gdyż wymienione wyżej procesy 1-3, odpowiedzialne za składowe tłumienia q_E , q_T , q_I nie zdążyły rozwinąć się przy krótkotrwałym impulsie światła (Ryc. 4a). Jeżeli jednak taki sam impuls wysycający jest podany na roślinę już oświetloną światłem ciągłym nie dającym zamykania RC (Ryc. 4b), to uzyskuje się niższe wartości maksimum (f_m) co wynika z obecności procesów tłumienia niefotochemicznego przy braku tłumienia fotochemicznego (q_P) zahamowanego wskutek zamknięcia RC po podaniu impulsu. Zatem udział tłumienia fotochemicznego i niefotoche-

micznego można oznaczyć ilościowo przez porównanie krzywych indukcji uzyskanych po impulsie wysycającym podanym w obecności i nieobecności oświetlenia ciągłego. Zasada obliczania wartości q_P i q_N z pomiarów fluorescencji impulsowej wyjaśniona jest na rycinach 4a-c. Na rycinie 4c występuje nałożenie 2 typów krzywych indukcji: krzywa I, bardziej rozciągnięta w czasie, powstała na skutek włączenia oświetlenia ciągłego, nie dającego zamykania RC i krzywe II będące skutkiem impulsów wysycających. Poziom f_0 na rycinie 4b odpowiada krzywej I na rycinie 4c.

Używając symboliki ryciny 4 otrzymujemy wzory (3) i (4) służące do wyliczenia składowych q_P i q_N .

$$q_P = (f_m - f_0) / (f_m - f_0') \quad (3)$$

$$q_N = 1 - (f_m - f_0') / (F_M - F_0) \quad (4)$$

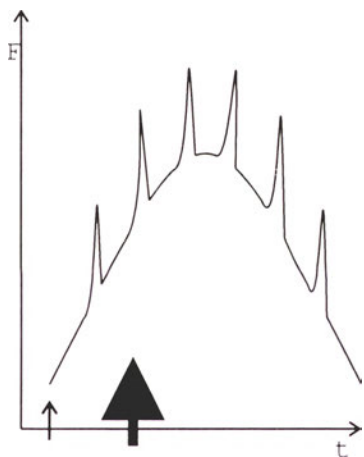
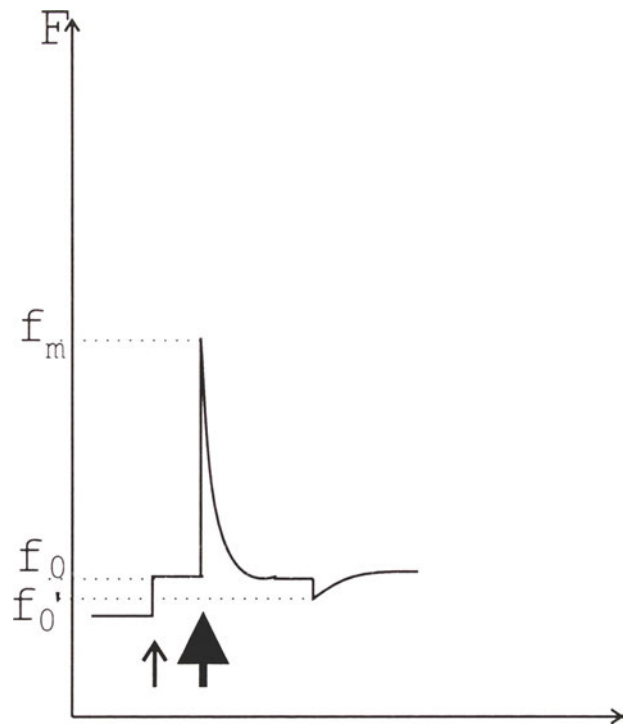
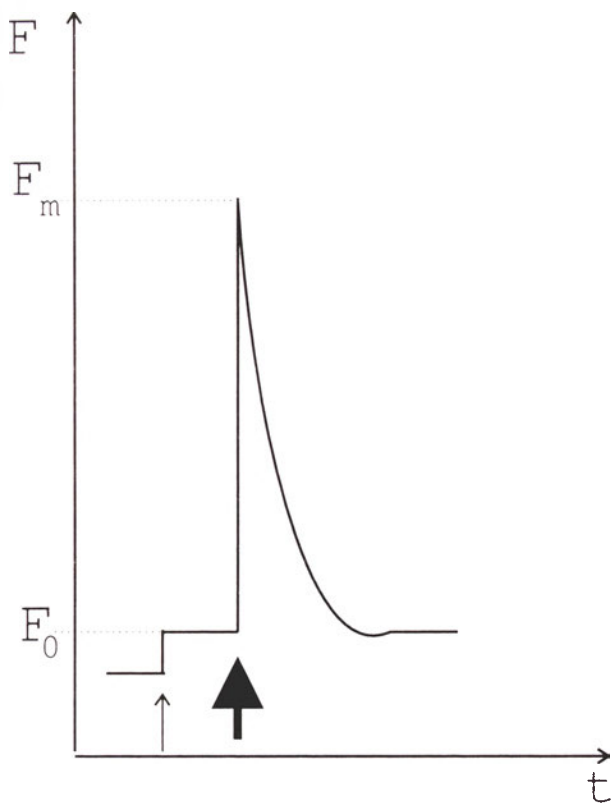
Oznaczenie składowych tłumienia opisaną metodą ma duże znaczenia w badaniach fotosyntezy. Alternatywnie składniki tłumienia mogą także być rozseparowane przez dodatek inhibitorów fotosyntezy i porównanie krzywych indukcji w obecności i nieobecności inhibitora.

III-3. Badanie wpływu inhibitorów fotosyntezy na składniki tłumienia indukowanej fluorescencji chlorofilu

Wpływ inhibitorów fotosyntezy na krzywe indukcji przemawia za istnieniem powiązania między czasowym przebiegiem zmian fluorescencji a kolejnymi etapami fotosyntezy.

Jak wiadomo z pomiarów wydzielania tlenu, zużycia CO_2 i badań fluorymetrycznych potraktowanie liścia 3-(3',4'-dichlorometylo)-N,N'-dimetylomocznikiem (DCMU) hamuje przeniesienie elektronu w RC z Q_A na Q_B — na skutek zablokowania [9, 12] czy uszkodzenia struktury przestrzennej [13] miejsca wiążącego Q_B w białku transmembranowym wchodzącym w skład PSII.

Należałoby więc spodziewać się, że DCMU blokując przepływ elektronów będzie utrzymywać zredukowaną formę Q_A^- i tym samym zamkniętą formę RC co według interpretacji podanej wyżej w rozdziale 1 powinno dać w efekcie wzrost fluorescencji. Efekt taki w rzeczywistości jest zawsze w tych warunkach widoczny. Dodatek DCMU do oświetlonej zawiesziny chloroplastów [46] z liści szpinaku daje dwufazowy wzrost fluorescencji z czasami połowicznego przereagowania $t_1 = 1 s$ i $t_2 = 15 s$. (Ryc. 5). Pierwszy z tych procesów składowych wiąże się z przeniesieniem elektronu z Q_A na Q_B i z zanikiem tłumienia fotochemicznego q_P a drugi powolniejszy proces przypisuje się wtórnemu zanikowi tłumienia zależnego od ener-

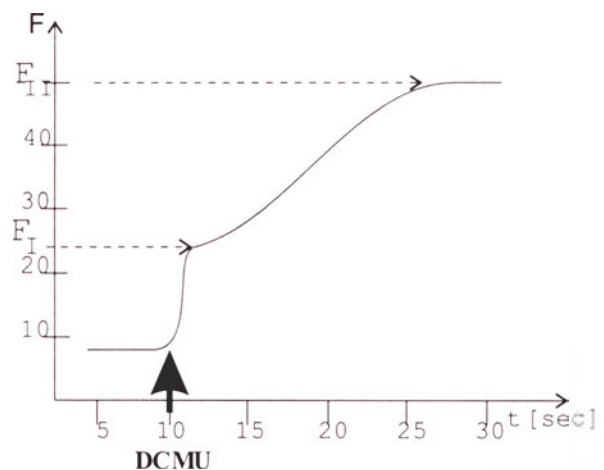


Ryc. 4. (zmodyfikowany z pracy [42]): Fluorescencja (F) tkanki roślinnej jako funkcja czasu (t) mierzona w fluorymetrze impulsowym. Ryc. 4a — w nieobecności oświetlenia ciągłego. Ryc. 4b — przy oświetleniu ciągłym ($150 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 650 nm, $\lambda < 600$ nm). Ryc. 4c — krzywa indukcji (schemat) otrzymana po włączeniu (\uparrow) oświetlenia ciągłego pobudzającego fotosyntezę przy periodycznie powtarzanych impulsach wysycających (\blacktriangleright), modulowane światło ($5\text{--}10 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 650 nm), wysycający impuls światła (0.5 s, $5000 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 650 nm), słabe światło pobudzające fotosyntezę: $100 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

gii q_E [46]. Zatem porównanie krzywych indukcji w obecności i nieobecności DCMU daje możliwość wyznaczenia q_P i q_E gdyż $(q_P + q_E) = (F_{II} - F_0)$ (Ryc. 5). Składowa tłumienia q_E może być selektywnie zniesiona przez dodatek antymycyny [9]. Mechanizm tego efektu nie może być wyjaśniony tak łatwo jak w przypadku DCMU. Powiązanie procesu „energizacji” błony tylakoidu z syntezą ATP i rozkładem wody [28, 30] jest powodem utrudnienia interpretacji zjawisk z tym związanych. Jednak efekt ten daje możliwość przybliżonej oceny rozmiarów q_E przez porównanie krzywej indukcji w obecności i nieobecności antymycyny.

Tłumienie fotoinhibitorowe q_I może być selektywnie zniesione przez dodatek ditionioerytrytu — (DTT) czynnika redukującego, dającego hamowanie deepoksydacji wiolaksantyny [42].

Składowa tłumienia q_T związana z przejściem fazowym w chloroplastach może być selektywnie wy-



Ryc. 5. Zmiany fluorescencji (F [jedn. względne]) chloroplastów po dodaniu DCMU — jako funkcja czasu (t [sec]). Rysunek schematyczny według pracy [32].

eliminowana przez dodatek fluorku sodu jako inhibitora fosfatazy, która jest konieczna do ufosforylowania białek. Fosforylacja białek kompleksów antenowych daje bowiem zmniejszenie adhezji w granach chloroplastu powodując wzrost odległości między cząsteczkami chlorofilu w kompleksie, co prowadzi do zmniejszenia prawdopodobieństwa transferu energii do RC w PSII, oraz do wzrostu k_n (wzór (2)) co z kolei prowadzi do zmniejszenia intensywności fluorescencji. Zahamowanie fosfatazy przez NaF daje więc zniesienie q_T [9, 11, 42] a porównanie wartości F_M w obecności i nieobecności NaF daje możliwość obliczenia q_T .

Badanie składowych tłumienia fluorescencji q_P , q_N , q_E , q_I , q_T przyczyniają się do pogłębienia wiedzy nie tylko o samym procesie fotosyntezy lecz też o towarzyszących reakcjach i o mechanizmach adaptacji organizmu do warunków ekstremalnych [31].

IV. Przykłady zastosowań pomiarów fluorescencji chlorofilu

Metody luminescencyjne jako nieinwazyjne i cechujące się małą bezwładnością nadają się szczególnie do badania szybkich procesów transportu elektronu. Porównanie wyników badań fluorymetrycznych z wynikami innych metod, takich jak wymiana gazowa, pomiar potencjałów czynnościowych czy fotoakustyka [47] umożliwia poznanie zależności między reakcjami fotosyntezy jak wydzielanie tlenu w PS II i niecykliczny transport elektronów w PS I [11, 30, 31, 46]. Współzależności te są obiektem intensywnych badań i przedstawienie ich wykracza poza ramy obecnego przeglądu.

Produkcja ATP daje zmniejszenie potencjału chemicznego błony ($\Delta\mu H^+$) co pociąga za sobą zmniejszenie gradientu pH i zatem zmniejszenie tłumienia (q_E) [11]. Zatem równoczesne oznaczanie q_E i stężenia ATP pozwala na śledzenie zależności między gradientem protonów, potencjałem błony i fosforylacją ADP [11, 28], tak istotnej w świetle hipotezy chemiosmotycznej. Porównanie czasowych zmian fluorescencji (F_V — zob. równ.(2)) ze zmianami absorpcji karotenoidów (515 nm) i zawartością tlenu daje wgląd w mechanizmy wiążące wydzielanie tlenu z transportem elektronów [48]. Oznaczanie stosunku $F_V/[O_2]$ jest używane jako miara stanu utlenienia układów fotosyntetycznych PSII i PSI co jest potrzebne w badaniach wpływu różnych czynników, jak herbicydy, na fotosyntezę [28, 46]. Porównanie zmian fluorescencji i wydzielania CO_2 umożliwia poznanie zależności między „ciemnymi” reakcjami fotosyntezy a transportem elektronów [38]. Badanie

wplywu analogów plastochinonu, różniących się potencjałem redox, przyczyniło się do wykrycia i wyjaśnienia roli aktywnych (α) i nieaktywnych (β) centrów reakcji w PS II [9, 34]. Modyfikacja chemiczna analogów plastochinonu (PQ) powoduje określone zmiany powinowactwa do elektronów a zatem i potencjału redoks. Otrzymuje się w ten sposób analogi PQ o wzrastającym potencjale redoks które wykazują selektywność względem poszczególnych stopni narastania sygnału na krzywej indukcji typu przedstawionego na rycinie. 3 (F_I, F_J). W powiązaniu z interpretacją krzywej indukcji przy oświetleniu ciągłym podanej w rozdziale III umożliwia to ocenę roli wybranych procesów fotosyntezy w roślinie. Poziom sygnału F_I jest związany z obecnością nieaktywnych form RC, w których zahamowane jest przeniesienie elektronu od Q_B do puli komórkowej. Dodatek analogów PQ o zwiększonym potencjale redoks prowadzi do obniżenia poziomu F_I co jest tłumaczone zmniejszeniem roli centrów nieaktywnych.

Bez rozwoju metod fluorymetrycznych byłoby niemożliwe dokładne poznanie zjawiska fotoinhibicji, umożliwiającego ochronę roślin przed szkodliwym nadmiarem energii [13, 49]. Nadmiar taki jest szkodliwy dla roślin ze względu na możliwość powstawania 1O_2 i nadtlenków [31, 50] które, ze względu na swą reaktywność chemiczną powodują degradację czy zmiany ważnych dla życia składników rośliny. Ponadto nadmierne oświetlenie powoduje przewagę procesów utleniania związanych z PSII nad procesami redukcji związanymi z PSI, co może prowadzić do wzrostu szkodliwego zjawiska fotorespiracji [51]. Fotoinhibicja polega na uruchomieniu drogi dezaktywacji stanu wzbudzonego chlorofilu w antenach i RC (PSII), innej niż przez reakcję fotochemiczną. Efekt taki powoduje tłumienie fluorescencji, jeśli dodatkowa droga dezaktywacji polega na bezpromienistym zaniku stanu wzbudzonego (wzrost wartości k_n — równ. (2)).

Badanie zależności krzywych indukcji i F_V/F_M od intensywności oświetlenia pozwoliło na poznanie korelacji między procesami dezaktywacji bezpromienistej wyrażonej przez parametry q_N i k_n (wzór (1)) a poziomem zeaksantyny [52-55] która ma być odpowiedzialna za rozpraszanie nadmiaru energii świetlnej w postaci ciepła. Proces ten prawdopodobnie polega na enzymatycznej deepoksydacji wiołaksantyny do zeaksantyny i transferze energii z chlorofilu w antenach na zeaksantynę [13, 31, 52], która posiada trudny do wykrycia eksperymentalnego, lecz dający się stwierdzić metodami obliczeniowymi poziom elektronowy niższy niż chlorofil [31, 56]. Ba-

kania spektrofluorymetryczne wykazały [52-54], że wartość k_n jest lepszym miernikiem bezpromieniste-go rozpraszania energii przy fotoinhibicji niż q_N co tłumaczy się tym, że na tłumienie niefotochemiczne (q_N) składają się inne czynniki (q_E , q_T) oprócz tłumienia fotoinhibitorowego (q_I). Z drugiej jednak strony q_N jest łatwiejsze do eksperymentalnego wyznaczenia niż k_n . Wykazano też współzależność między depoksydacją wiolaksantyny a transportem elektronów i protonów [31, 57, 58]. Badania te nasuwają przypuszczenie, że przemiany barwników ksantofilowych są związane z przejściem konformacyjnym w obrębie kompleksów antenowych [13, 31, 49].

Metodami fluorymetrycznymi, przy zastosowaniu techniki impulsowej zbadano [51, 53-55] tłumienie niefotochemiczne (q_N) i parametry F_V/F_M i F_V/F_0 (wzory (1) i (2)) w zależności od intensywności światła aktywnego 700 — 1400 $\mu E m^{-2} s^{-1}$. Badania takie [59] były przeprowadzone na odmianie cisu wykazującej metabolizm typu CAM, który sam przez się niweluje częściowo skutki nadmiernego oświetlenia. Stwierdzono, że wzrost dawki promieniowania powoduje wyraźny wzrost tłumienia q_N .

Bardzo interesujące są badania zmian fluorescencji tkanek roślinnych przy oświetleniu pojedynczym impulsem [60]. W pewnych warunkach, przy zastosowaniu czulej aparatury stwierdzono periodyczne narastanie i zmniejszanie intensywności fluorescencji, co wyjaśniono przez oscylacyjne dochodzenie do równowagi współzależnych procesów transportu elektronu i protonu i rozkładu wody w PSII.

Metody luminescencyjne są też szeroko wykorzystywane do badania stanu fizjologicznego roślinności, wpływu zanieczyszczeń i degradacji środowiska na stan organizmów fotosyntetyzujących.

V. Zastosowanie metod luminescencyjnych do badania stanu roślin i stresu

Działalność gospodarcza człowieka powoduje degradację środowiska naturalnego. Prowadzi to do pogorszenia warunków wegetacji a nawet do zaniku roślinności na pewnych obszarach. Z tego względu byłoby bardzo korzystne opracowanie metody szybkiego wykrywania zagrożenia przed pojawieniem się nieodwracalnych zmian. Metody luminescencyjne są często wykorzystywane do badania stanu roślin.

Duże znaczenie w badaniu stanu środowiska mają zdalne pomiary — wzbudzonej laserem z samolotu czy satelity — fluorescencji chlorofilu zawartego w roślinach [1, 30]. Przy zastosowaniu światła wzbudzającego o określonej częstotliwości impulsów i długości fali można badać zdalnie fluorescencję mi-

kroorganizmów morskich czy lasów na dużych obszarach przy pełnym świetle słonecznym [36, 61]. Wyznaczając stosunek F_{690}/F_{735} (zob wstęp) określa się w ten sposób stopień zagrożenia środowiska.

Do określania wpływu czynników stresowych na rośliny wykorzystuje się pomiary F_V/F_M , q_P , q_N [48, 62, 63]. Do badania struktury i stanu kompleksów antenowych zastosowanie znajduje fakt, że powierzchnia **nad** krzywą indukcji (P) jest proporcjonalna do ilości cząsteczek chlorofilu w kompleksie antenowym [3, 9].

$$P = \int_{t=0}^{t=t_m} (F_M - F) dt \quad (5)$$

gdzie t_m oznacza czas w jakim sygnał na krzywej indukcji osiąga wartość F_M .

Ponadto do diagnozowania stanu roślin stosuje się parametry eksperymentalne jak wartość Rfd ($Rfd = (F_M - F_S)/F_S$) i współczynnik adaptacji $A_p = 1 - (1 + Rfd_{735}) / (1 + Rfd_{690})$ [1]. Dla normalnych organizmów fotosyntetyzujących żyjących w bezstresowych warunkach otrzymuje się najczęściej [1, 3, 64] następujące parametry fluorescencji: $F_{690}/F_{735} = 0.8-1.0$, $F_V/F_M = 0.8-0.9$, $Rfd_{690} = 3-5.8$, $Rfd_{735} = 1-2.5$, $q_P = 0.8$, $q_E = 0.35$, $A_p = 0.1-0.3$. Liczne wyniki wskazują, że ochłodzenie powoduje znaczny spadek wartości F_V/F_M (od 0.83 do 0.68-0.36) przy stałej wartości F_0 . Przegrzanie roślin daje zmniejszenie F_V/F_M przy wzroście F_0 [1, 9]. Tłumaczy się to uszkodzeniem aparatu fotosyntetycznego na skutek przegrzania i niepełnym wykorzystaniem energii świetlnej, która częściowo jest przetwarzana na fluorescencję. Badano też wpływ herbicydów [1], ultrafioletu (UV-B) [65, 66], zanieczyszczeń powietrza [1] i gleby (np. metalami) [64, 67] na fluorescencję chlorofilu w roślinach. W literaturze istnieje wiele danych o zmianach krzywych indukcji pod wpływem czynników stresowych [1, 3, 30, 32, 37, 38, 52, 68-70]. Dane te najczęściej były uzyskane w różnych warunkach i przy zastosowaniu odmiennej aparatury. Stąd dla większości z tych pomiarów nie można znaleźć wspólnej wartości porównawczej. Względne zmiany obserwowanych parametrów luminescencji powtarzają się dla zdecydowanej większości eksperymentów. Nadmierne oświetlenie promieniowaniem widzialnym powoduje spadek F_V (wzór 2) i q_P (III-2 i wzór 4) przy wzroście F_0 [1, 41]. Przy umiarkowanych dawkach UV-B obserwuje się wyraźne zmniejszenie F_V/F_M przy stałym F_0 i F_S , [1, 9]. W obecności stresowych czynników środowiskowych, takich jak amoniak lub tlenek siarki obserwowano spadek F_M i F_V/F_M i wszystkich składników tłumienia [1, 9]. Niedobór składników mineralnych powoduje znaczne zmniejszenie P (wzór 5) co jest oznaką uszkodze-

nia anten [9]. Istnieją też doniesienia o wykorzystaniu krzywych indukcji do określania stopnia degradacji lasów [3, 68, 70]. Znaczne uszkodzenie drzewostanu powoduje wyraźne zmiany krzywych indukcji i spadek wartości F_v/F_m . Jednak dokładne badania wpływu zanieczyszczeń powietrza (SO_3 , O_3) na świerki nie wykazały wyraźnych zmian krzywych indukcji, choć zauważono efekt tych czynników na opóźnioną luminescencję (LDL) [19-22]. Ponieważ, jak opisano to w rozdz. I, krzywe indukcji są ściśle związane z transportem elektronów w PSII badanie krzywych indukcji nadaje się do wykrywania szkodliwego wpływu tylko takich czynników, które powodują uszkodzenie funkcjonowania PSII. Jeżeli uszkodzenie występuje w innym etapie fotosyntezy, może ono nie dawać wyraźnych zmian krzywych indukcji. Dopiero więc wyniki różnych metod luminescencyjnych w połączeniu z innymi metodami badania stanu roślin, jak wymiana gazowa CO_2 i O_2 czy pomiary elektrycznych potencjałów czynnościowych mogą stanowić podstawę do wnioskowania o zagrożeniu.

Rozwój metod pomiarowych jest obecnie skierowany na poznanie zależności fluorescencji od rodzaju tkanki roślinnej w obrębie jednego organizmu. Specjalnie zaprojektowane układy optyczne i elektroniczne pozwalają na badanie przyżyciowe dające obraz (*image*) parametrów fluorescencji tkanki roślinnej — np. całego liścia [30, 68, 69]. Pozwala to na poznanie różnic w przebiegu fotosyntezy w różnych anatomicznych częściach rośliny. Doświadczenia takie dają nowe możliwości poznawcze w fizjologii roślin i botanice niedostępne przy pomocy innych znanych metod badania fotosyntezy.

Próbowano też wykorzystać fluorescencję w różnych zakresach długości fali [70] oprócz emisji długofalowej pochodzącej od chlorofilu. Wyniki te wykazują zależność od działania stresu, lecz ich interpretacja jest utrudniona ze względu na pochodzenie obserwowanego sygnału od różnych substancji jak białka, flawonoidy, chinony i inne związki wchodzące w skład roślin, a nie zawsze dobrze poznane.

Podziękowania

Autor pragnie wyrazić serdeczne podziękowanie dr E. Ślesakowi z Instytutu Botaniki Uniwersytetu Wrocławskiego za liczne i owocne dyskusje.

Artykuł otrzymano 13 października 1997 r.

Zaakceptowano do druku 3 grudnia 1998 r.

Piśmiennictwo

- Karukstis K (1991) W: Scheer H (red.): *The Chlorophylls* CRC, Boca Raton str.769-795
- Scherer P, Fischer O (1991) W: Scheer H (red.) *The Chlorophylls* op.cit. str.1079-1098
- Lichtentaler H, Buschman C, Rinderle U, Schmuck G (1986) *Radiation Environ. Biophys.* **25**: 297-308
- Kawski A (1992) *Fotoluminescencja roztworów*, PWN Warszawa
- Lakowicz J (1983) *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Plenum, New York
- Parson W (1991) w: Scheer H (red.) *The Chlorophylls* op.cit. str.1154-1175
- Hoff A, Amesz J (1991) w: Scheer H (red.) *The Chlorophylls* op.cit. str.723-737
- Kasha M, Rawls H, El Bayoumi M (1965) *Pure Applied Chem* **11**: 371-392
- Krause G, Weiss E (1991) *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **42**: 313-349
- Kautsky H, Hirsch A (1931) *Naturwissenschaften* **19**: 964-971
- Nicholls D, Ferguson S (1995) *Bioenergetyka 2*, PWN Warszawa
- Stryer L (1997) *Biochemia*, PWN Warszawa
- Hendrich W (1995) *Acta Physiol Plant* **17**: 153-165
- Schatz G, Brock H, Holzwarth A (1988) *Biophys J* **54**: 397-405
- Liebl W, Breton J, Deprez J, Trissl H (1989) *Photosynth Res* **22**: 257-275
- Holzwarth A (1996) W: Lichtentaler H (red.) *Applications of Chlorophyll Fluorescence*. Kluwer, Dordrecht
- Klimov V, Klevanik A, Shuvalov V, Krasnovsky A (1977) *FEBS Lett* **81**: 183-186
- Breton J (1982) *FEBS Lett* **147**: 16-20
- Schneckenburger H, Frenz M (1986) *Radiation Environ Biophys* **25**: 289-295
- Schmidt W, Schneckenburger H (1990) *ECO 3 Proceedings SPIE Hague 1990* Vol 1269 str.145-156
- Schneckenburger H, Schmidt W (1991) *Radiation Environ Biophys* **30**: 1-9
- Schmidt W, Schneckenburger H (1992) *Radiation Environ Biophys* **31**: 63-72
- Radenovic C, Markovic D, Jeremic M (1994) *Photosynthetica* **30**: 1-24
- Butler W, Kitajima M (1975) *Biochim Biophys Acta* **176**: 116-125
- Kitajima M, Butler W (1975) *Biochim Biophys Acta* **176**: 105-115
- Holzwarth A, Roelofs T (1992) *J Photochem Photobiol B Biol* **15**: 45-62
- Small G, Hayes J (1992) *J Phys Chem* **96**: 7499-7901
- Bradbury M, Baker N (1981) *Biochim Biophys Acta* **635**: 542-551
- Renger G (1987) *Angewandte Chem (Int.Ed.)* **26**: 643-660
- Rolfe S, Scholes J (1995) *New Phytology* **131**: 69-79
- Horton P, Ruban A, Walters R (1996) *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **47**: 655-684
- Öquist G, Wass R (1988) *Physiol Plant* **73**: 211-217
- Karukstis K (1992) *J Photochem Photobiol B Biol* **15**: 63-74
- Cao J, Govindjee (1990) *Biochim Biophys Acta* **1015**: 180-188
- Munday J, Govindjee (1990) *Biophys J* **9**: 1-21
- Graan T, Ort D (1986) *Biochim Biophys Acta* **852**: 320-330
- Siffel P, Braunova Z, Sindlerova E, Cudin P (1996) *J Plant Physiol* **148**: 271-275
- Laisk A, Loreto F (1996) *Plant Physiol* **110**: 903-912
- Krüger A, Moya I, Weis E (1993) *Biochim Biophys Acta* **1102**: 167-176
- Krüger A, Weis E (1993) *Photosynth Res* **37**: 117-130
- Demmig-Adams B, Adams W (1996) *Trends Plant Sci* **1**: 21-26

42. Schreiber U, Bilger W (1993) *Progress in Botany* **54**: 151-173
43. Hodges M, Cornic G, Briantais J-M (1989) *Biochim Biophys Acta* **974**: 289-293
44. Bilger B, Björkman O (1990) *Photosynth Res* **25**: 173-185
45. Genty B, Wonder J, Baker N (1990) *Photosynth Res* **26**: 133-139
46. Krause G, Vernet J, Briantais J-M (1982) *Biochim Biophys Acta* **679**: 116-124
47. Puchenkova O, Kopf Z, Malkin S (1995) *Biochim Biophys Acta* **1231**: 197-212
48. Verkhovskiy M, Morgan J, Wikström M (1995) *Biochemistry* **34**: 7483-7491
49. Gruszecki W (1995) *Acta Physiol Plant* **17**: 145-152
50. Hippelli S, Elstner E (1996) *J Plant Physiol* **148**: 249-257
51. Adams W, Demmig-Adams B (1993) W: Yamamoto H, Smith C (red.) *Photosynthetic Response to Environmental Stress. American Soc Plant Physiology* Rockville str.27-35
52. Demmig-Adams B, Winter K, Krüger A, Czygan F (1989) *Plant Physiol* **90**: 887-893
53. Demmig-Adams B, Winter K, Krüger A, Czygan F (1989) *Plant Physiol* **90**: 881-886
54. Demmig-Adams B, Adams W, Heber U, Neimann S, Winter K, Krüger A, Czygan F, Bilger W, Björkman O (1990) *Plant Physiol* **92**: 293-301
55. Adams W, Demmig-Adams B, Winter K (1990) *Plant Physiol* **92**: 302-309
56. Frank H, Cua A, Chynwatt V, Young A, Gasztola D, Wasielewski M (1994) *Photosynth Res* **41**: 389-395
57. Haertel H, Lokstein H, Grimm B, Rank B (1996) *Plant Physiol* **110**: 471-482
58. Gruszecki W, Krupa Z (1993) *Z Naturforsch* **48c**: 46-51
59. D'Ambrosio N, Schindler Ch, Virzo De Santo A, Lichtentaler H (1996) *J Plant Physiol* **148**: 135-141
60. Dalrieu M (1995) *Biochim Biophys Acta* **1231**: 47-57
61. Neale P, Cullen J, Lesser M, Melis A (1993) W: Yamamoto H, Smith C (red.) *Photosynth Response to Environ. Stress* op.cit. str.61-77
62. Teramura A, Sullivan J (1993) W: Yamamoto H, Smith C (red.) *Photosynth Response to Environ. Stress* op.cit. str.37-43
63. Neubauer C, Yamamoto H (1993) W: Yamamoto H, Smith C (red.) *Photosynth Response to Environ. Stress* op.cit. str. 166-171
64. Krupa Z, Baszyński T (1995) *Acta Physiol Plant* **17**: 177-190
65. Barnes P, Ballare C, Caldwell M (1996) *J Plant Physiol* **148**: 15-20
66. Miles D (1993) W: Yamamoto H, Smith C (red.) *Photosynth Response to Environ. Stress* op.cit. str.136-143
67. Krupa Z, Öquist G, Hunner N (1993) *Acta Physiol Plant* **88**: 626-630
68. Schmuck G, Lichtentaler H (1986) *Internat Geosci and Remote Sensing Symp (IGRASS) Zurich ESA Sci Tech Publ* Noordwijk str.95-100
69. Lichtentaler H, Lang M, Sowińska M, Heisel F, Miehe J (1996) *J Plant Physiol* **148**: 613-621
70. Lang M, Siffel P, Braunova Z, Lichtentaler H (1992) *Botanica Acta* **105**: 345-350

Informacja o XXXV Zjeździe Polskiego Towarzystwa Biochemicznego

W dniach 13-16 września br. obradował w Olsztynie-Kortowie XXXV Zjazd Polskiego Towarzystwa Biochemicznego. Organizatorem Zjazdu był Oddział Olsztyński Towarzystwa.

Komitet Organizacyjny ukonstytuował się wiosną 1998 roku w składzie:

Przewodniczący — prof. dr hab. Jan Glogowski (Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności PAN)

Wiceprzewodnicząca — prof. dr hab. Elżbieta Kostyra (Wyższa Szkoła Pedagogiczna)

Sekretarz — dr Maria Młot (Wyższa Szkoła Pedagogiczna)

Członkowie — mgr Regina Frączek, dr Dariusz Hołody, dr Władysław Kordan, mgr Anna Martiszewicz, mgr Małgorzata Przybylska.

W skład **Komitetu Naukowego** ze strony Organizatorów weszli:

Prof. dr hab. Jerzy Strzeżek (Akademia Rolniczo-Techniczna)

Prof. dr hab. Henryk Kostyra (Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności PAN)

Powołano także **Komitet Honorowy Zjazdu**, w skład którego weszli:

Wojewoda Warmińsko-Mazurski — Zbigniew Babalski

Prezydent Miasta Olsztyna — Janusz Cichoń

Rektorzy:

prof. dr hab. Ryszard Górecki

prof. dr hab. Józef Górniewicz

ksiądz Jan Guzowski

prof. dr hab. Stefan Smoczyński

prof. dr hab. Andrzej Staniszewski

Dyrektorzy Instytutów Naukowych:

prof. dr hab. Tadeusz Krzymowski

prof. dr hab. Halina Kozłowska

prof. dr hab. Jan Szczerbowski

prof. dr hab. Stanisław Achremczyk

W dniu 13 września w Auli WSP (ul. Głowackiego 17) nastąpiło uroczyste otwarcie XXXV Zjazdu Polskiego Towarzystwa Biochemicznego. XXXV Zjazd PTBioch był trzecim Zjazdem, zorganizowanym przez Oddział Olsztyński. Olsztyn, a głównie Wyższa Szkoła Rolnicza, w dziewiętnastym roku swojej działalności (rok 1968) gościła Uczestników VI Zjazdu. Jubileuszowy, XX Zjazd Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, obradował w obiektach Akademii Rolniczo-Technicznej, która świętowała w tym czasie swoje 35-lecie (rok 1984).

Uroczyste otwarcie XXXV Zjazdu PTBioch zagał Przewodniczący Komitetu Organizacyjnego oraz Przewodniczący Oddziału w Olsztynie, profesor Jan Glogowski, a następnie przywitał przybyłych gości.

Na uroczyste otwarcie Zjazdu przybyli:

Wicewojewoda Warmińsko-Mazurski, Marek Żyliński

JM Rektor Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego, profesor Ryszard Górecki

I Zastępca Rektora, profesor Józef Górniewicz

Prorektor ds. Nauki, profesor Jan Jankowski

Przewodniczący Olsztyńskiego Forum Naukowego, profesor Tadeusz Krzymowski,

członek rzeczywisty Polskiej Akademii Nauk

Wicedyrektor Instytutu Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności PAN, profesor Adam Zięćik

Prodziekan Wydziału Biologii Uniwersytetu W-M, profesor Czesław Hołdyński
Światowej sławy farmakolog, profesor Ryszard J. Gryglewski, Członek Rzeczywisty Polskiej
Akademii Nauk, Kierownik Katedry Farmakologii Collegium Medicum Uniwersytetu
Jagiellońskiego

Członkowie Honorowi PTBioch:

prof. dr hab. Kazimierz Zakrzewski
prof. dr hab. Zygmunt Machoy
prof. dr hab. Jerzy Chmielowski

Władze Zarządu Głównego PTBioch:

prof. dr hab. Jolanta Barańska — Prezes Zarządu Głównego
prof. dr hab. Liliana Konarska — Wiceprezes Zarządu Głównego
doc. dr hab. Dariusz Stępkowski — Sekretarz Zarządu Głównego

Dyrektor Wydziału Rolnictwa i Ochrony Środowiska Urzędu Wojewódzkiego w Olsztynie,
inż. Lucjan Wołos

Mgr Barbara Olszewska, reprezentująca Prezydenta Miasta Olsztyna.

Po powitaniu gości, głos zabrał Wicewojewoda, Marek Żyliński, który w imieniu Wojewody, Zbigniewa Babalskiego, życzył Uczestnikom owocnych obrad i przyjemnego spędzenia czasu w Olsztynie.

Następnie głos zabrał JM Rektor Uniwersytetu W-M, prof. Ryszard Górecki.

Przedstawił Uczestnikom Zjazdu strukturę nowo utworzonego Uniwersytetu oraz życzył wszystkim owocnych obrad i miłego spędzenia czasu w Kortowie.

Z kolei zabrała głos profesor Jolanta Barańska, i jako prezes Towarzystwa dokonała właściwego otwarcia XXXV Zjazdu, dziękując organizatorom za ich pracę a Uczestnikom za przybycie. Następnie Kol. Prezes powiadomiła zebranych o wynikach prac komisji, powołanych przez Zarząd Główny Towarzystwa do przyznania nagród imienia Jakuba Karola Parnasa i Bolesława Skarżyńskiego. Nagrodę imienia **Parnasa** otrzymali koledzy: **Agnieszka Szalewska-Pałasz, Alicja Węgrzyn, Adam Błaszczak, Karol Taylor oraz Grzegorz Węgrzyn** za pracę opublikowaną w Proc. Natl. Acad. Sci USA. Nagrodę imienia **Skarżyńskiego** otrzymały koleżanki: **Agnieszka Krakowiak i Maria Koziołkiewicz**. Następnie profesor Barańska wręczyła powołanemu przed rokiem na **Członka Honorowego** naszego Towarzystwa prof. **Jerzemu Chmielowskiemu** uroczysty dyplom. Wspólnie z przedstawicielem firmy Sigma-Aldrich prezes Barańska wręczyła ufundowaną przez tę firmę nagrodę za najlepszą pracę z dziedziny kwasów nukleinowych którą otrzymali koledzy **Radosław Tomaszewski, Elżbieta Mogielnicka i Andrzej Jerzmanowski**

Wspaniały wykład inauguracyjny pt. „**Regulacyjna rola tlenu azotu w układzie krążenia**” wygłosił wspomniany wyżej profesor **Ryszard Gryglewski**.

W części artystycznej wystąpił zespół kameralny „Pro Musica Antiqua”.

Uroczyste Otwarcie zakończono tradycyjną lampką wina.

Obrady Zjazdu odbywały się w salach dydaktycznych Uniwersytetu W-M w Kortowie w dniach 14-16 września. Wzięło w nich udział 419 Uczestników, a obrady toczyły się w ośmiu Sesjach tematycznych:

- I. Komórkowe i pozakomórkowe działanie enzymów — organizator i przewodniczący Sesji — prof. Grzegorz Bartosz (3 wykłady, 20 doniesień ustnych, 53 postery)
- II. Inhibitory enzymów proteolitycznych — prof. Adam Dubin i doc. Andrzej Ciereszko (2 wykłady, 10 doniesień ustnych, 18 posterów)
- III. Mechanizm regulacji komórkowych — Sesja posterowa (20 posterów)
- IV. Biochemia kwasów nukleinowych — prof. Jan Barciszewski (6 wykładów, 7 wystąpień ustnych, 24 postery)
- V. Glikoproteiny i ich metabolizm — prof. Henryk Kostyra (1 wykład, 4 doniesienia ustne, 10 posterów)
- VI. Biotechnologia molekularna — prof. Andrzej Płócienniczak (1 wykład, 10 doniesień ustnych, 11 posterów)

— VII. Markery molekularne w diagnostyce klinicznej — prof. Edward Bańkowski i prof. Krystyna Olczyk (1 wykład, 24 doniesienia ustne, 27 posterów)

— VIII. Doniesienia różne — prof. Krystyna Żółtowska i dr hab. Zofia Luberda-Bieńkowska (8 doniesień ustnych, 122 postery)

W trakcie trzydniowych obrad wygłoszono zatem łącznie 14 wykładów sesyjnych oraz zaprezentowano 368 doniesień naukowych, zarówno w formie ustnych komunikatów (83 doniesienia), jak i w sesjach posterowych (285 doniesień plakatowych). W Zjeździe brało ponadto udział 20 firm, oferujących sprzęt laboratoryjny i odczynniki chemiczne. Uczestnicy Zjazdu zakwaterowani byli w DS. 3 i DS. 6, a także w Hoteliku „Żak”. Wszyscy podziwiali stan Kortowskich Domów Studenckich oraz wspaniałe wyżywienie.

W dniu 14 września ponad 300 Uczestników brało udział w ognisku na terenie Ośrodka Jeździeckiego w Kortowie III, a 15 września prawie 90 osób w Spotkaniu Towarzyskim. Oficjalne zamknięcie XXXV Zjazdu PTBioch odbyło się 16 września br. o godz. 13³⁰.

Ogłoszono wyniki Konkursów o nagrody im. Włodzimierza Mozołowskiego i im. Janiny Opieńskiej-Blauth oraz wręczono nagrody, dyplomy i wyróżnienia. Do konkursu im. Włodzimierza Mozołowskiego zgłoszono 15 prezentacji. Komisja pod przewodnictwem prof. Jerzego Duszyńskiego przyznała nagrodę główną koleżance Agnieszce Kobielałak. Przyznano też wyróżnienie koleżance Iwonie Biedrzyckiej.

Komisja do spraw nagrody im. Janiny Opieńskiej-Blauth dla prac autorstwa studentów pod przewodnictwem dr Artura Jarmołowskiego przyznała następujące nagrody:

I nagrodę kolegom Jackowi Krajewskiemu i Tomaszowi Stefaniukowi

II nagrodę otrzymała Marta Ociepa a wyróżnienie Urszula Wilczyńska. Po wręczeniu dyplomów i nagród laureatom obu konkursów prof. Barańska podziękowała organizatorom za wzorową organizację Zjazdu i stworzenie przyjemnej atmosfery.

W jednomyślnej opinii uczestników Zjazd zakończył się sukcesem, zarówno organizacyjnym, jak i naukowym, a Kortowo wywarło jednoznacznie pozytywne wrażenie.

Na uroczystym zamknięciu prof. Jan Glogowski podziękował wszystkim, którzy przyczynili się do organizacji tak udanego Zjazdu.

Należy dodać, że nad technicznym zabezpieczeniem Zjazdu czuwała Fundacja im. M. Oczapowskiego, przy współpracy z Sekcją Terenów Zielonych i Utrzymania Porządku, zabezpieczenie socjalne zapewniła Fundacja Pomocy Studentom „Żak”, a kawę i napoje w czasie przerw w obradach serwowała firma „Arton”.

Dodatkowo grupa Uczestników Zjazdu w dniu 17 września uczestniczyła w wycieczce do Świętej Lipki.

Jan Glogowski

Komunikat Zarządu Głównego Polskiego Towarzystwa Biochemicznego o przyznanych w roku 1999 nagrodach za działalność naukową w dziedzinie biochemii

Nagrodę im. Jakuba Karola Parnasa za najlepszą pracę biochemiczną wykonaną w laboratoriach polskich w roku 1998 Zarząd Główny na wniosek komisji pod przewodnictwem profesora Grzegorza Bartosza przyznał zespołowi z Gdańska kierowanemu przez profesora Grzegorza Węgrzyna za pracę zatytułowaną **“DNA A’ – stimulated transcriptional activation of orilambda; *Escherichia coli* RNA polimerase beta subunit as a transcriptional activator contact site”** opublikowaną w: Proc. Natl. Acad. Sci USA 1998, 95,4241-4246 autorstwa kolegów **Agnieszki Szalewskiej-Pałasz, Alicji Węgrzyn, Adama Błaszczaka, Karola Taylora oraz Grzegorza Węgrzyna**

Komisja Zarządu Głównego powołana do przyznania nagrody imienia Bolesława Skarzyńskiego za najlepszą pracę przeglądową w czasopiśmie Towarzystwa “Postępy Biochemii” w roku 1998, kierowana przez doc. Iwonę Fijałkowską nagrodziła koleżanki: **Agnieszkę Krakowiak i Marię Koziółkiewicz**. Nagroda została przyznana za artykuł **“Oligonukleotydy o właściwościach aptamerycznych” opublikowany w *Postęпах Biochemii*, 1998, 4, 306-317.**

Dyplomy laureatom tych nagród wręczono w czasie uroczystości otwarcia XXXV Zjazdu Towarzystwa w Olsztynie. W czasie tej uroczystości wręczono także nagrodę przyznaną przez kapitułę kierowaną przez prof. Jana Barciszewskiego za najlepszą pracę z dziedziny kwasów nukleinowych wykonaną w kraju. Nagroda ta jest fundowana przez firmę Sigma-Aldrich. Nagrodę wręczali prof. Barańska prezes Towarzystwa wraz z prezesem polskiego oddziału firmy Sigma-Aldrich dr Aleksandrem Jankowskim. Nagroda przypadła w udziale zespołowi: **Radosław Tomaszewski, Elżbieta Mogielnicka, Andrzej Jerzmanowski** za pracę –**“Both the 5SRNA gene and the AT-rich flanks of *Xenopus laevis* oocyte-type 5S rDNA repeat are required for histone H1-dependent repression of transcription of pol III-type genes in *in vitro* reconstituted chromatin”** opublikowaną w Nucleic Acids Research 26(24):5596-5601, 1998

Na XXXV Zjeździe Towarzystwa w Olsztynie komisja pod przewodnictwem prof. Jerzego Duszyńskiego po zapoznaniu się z 15-toma prezentacjami młodych biochemików zgłoszonymi do konkursu o nagrodę im. Włodzimierza Mozołowskiego przyznała nagrodę główną mgr **Agnieszce Kobielał** współautorce wraz z prof. Wiesławem Trzeciakiem prezentacji plakatowej p.t. **“Utrata stabilności genu *Msx1*, wywołana mutacją w regionie kodującym 3’-UTR może powodować zaburzenia tworzenia zawiązków zębów”** Laureatka otrzymała dyplom i nagrodę pieniężną ufundowaną przez organizatorów Zjazdu. Przyznano też wyróżnienie za prezentację pracy: **Iwona Biedrzycka, Marian Sęktas, Tadeusz Kaczorowski** p.t. **“Charakterystyka plazmidu pEC156 niosącego geny systemu restrykcyjno-modyfikującego *EcoVIII*”** dla kol. **Iwony Biedrzyckiej** uhonorowane dyplomem.

Komisja nagrody im. Janiny Opieńskiej-Blauth dla prac autorstwa studentów prezentowanych na XXXV Zjeździe Towarzystwa w Olsztynie pod przewodnictwem dr Artura Jarmołowskiego przyznała następujące nagrody:

I nagrodę (ufundowaną przez Oddział Lubelski Towarzystwa) za pracę autorstwa studentów **Jacka Krajewskiego i Tomasza Stefaniaka** z Gdańska p.t. **“Rola reaktywnych form tlenu w ekspery-**

mentalnej nefrokarcinogenezie". Jest to praca z koła naukowego studentów przy Katedrze Biochemii AM w Gdańsku.

II nagrodę otrzymała studentka **Marta Ociepa** za pracę **"Estrogeny środowiskowe indukują ekspresję genów dla cytochromów CYP1A1 i CYP1A2 uczestniczących we wzmacnianiu działania estrogenów naturalnych w komórkach linii ustalonej raka sutka MCF-7"**

Wyróżnienie przyznano studentce **Urszuli Wilczyńskiej** za pracę p.t. **"Gen IL-12 w plazmidowym DNA w terapii genowej nowotworów u myszy**.

Dzięki uprzejmości Polskiego Wydawnictwa Naukowego II nagroda i wyróżnienie zostały nagrodzone książkami "Biochemia" Stryera i "Podstawy Biologii Komórki" autorzy Alberts i inni. Laureaci i wszyscy uczestnicy konkursu im. Janiny Opieńskiej-Blauth otrzymali dyplomy.

Zarząd Główny Polskiego Towarzystwa Biochemicznego gratuluje wszystkim laureatom i życzy im dalszej owocnej pracy. Składamy również szczególne podziękowania firmom Sigma-Aldrich i Polskiemu Wydawnictwu Naukowemu, których hojność pozwoliła uatrakcyjnić nagrody przyznawane naszym laureatom.

Dariusz Stępkowski
Sekretarz Zarządu Głównego

ARTYKUŁY

- Alicja Węgrzyn, Grzegorz Węgrzyn** — Regulacja replikacji DNA bakteriofaga λ i plazmidów λ 5
- Krzysztof Nieznański** — Regulacja ekspresji genów miozyna mięśniowych ssaków 12
- Grażyna Niewiadomska, Maciej Małecki** — Droga przekazywania sygnału przez czynnik wzrostu nerwów (NGF) i jego receptory TrkA i p75^{NTR} 21
- Magdalena Staszczak, Edyta Zdunek** — Proteoliza wewnątrzkomórkowa 32
- Janusz Błasiak, Beata Smolarz, Dagmara Piestrzeniewicz** — Urokinazowy układ aktywacji plazminogenu i jego znaczenie w progresji nowotworów 42
- Ryszard Oliński, Marek Jurgowiak** — Rola reaktywnych form tlenu w procesach mutagenyzy i karcynogenyzy 50
- Elżbieta Romanowska** — Adaptacja błon tylakoidowych do zmiennych warunków świetlnych środowiska 58
- Krzysztof Ziomek, Ryszard Kierzek** — Przewidywanie struktur drugorzędowych kwasów rybonukleinowych (RNA) 74
- Krzysztof Ziomek, Ryszard Kierzek** — Drugorzędowe motywy strukturalne RNA 80
- Marek Jaszczuk, Włodzimierz Zagórski-Ostoja, Danuta Hulanicka** — Mechanizm ekspresji genomu wirusów (+) RNA 87
- Agnieszka Makowska** — Oscylacje wapniowe uczestniczą w procesie regulacji ekspresji genów 95
- Krystyna Bogucka, Lech Wojtczak** — Efekt Crabtree wyrazem strategii metabolicznej szybko rosnących nowotworów i innych komórek proliferujących 100
- Czesław S. Cierniewski, Aleksandra Cierniewska-Cieślak, Zofia Pawłowska** — Współdziałanie receptora urokinazowego aktywatora plazminogenu z integrzynami podczas adhezji i migracji komórek 109
- Agnieszka Piekietko** — Białka choroby Alzheimerera 116
- Małgorzata Kłoszewska, Zdzisław Markiewicz** — Mechanizmy bakteryjnej odporności na wankomycynę i inne antybiotyki glikopeptydowe: rosnące zagrożenie 122
- Joanna Michalik, Ewa Szolajska** — Bakułowirusy — specyficzne wirusy owadzie. Budowa, infekcyjność i wykorzystanie w ekspresji obcych genów 137
- Jacek Bania, Antoni Polanowski** — Bioinsektycydy a mechanizmy obronne owadów 143
- Marcin Schmidt** — Geny intronowe 158
- Barbara Grzelakowska-Sztabert** — Udział wirusowych i komórkowych białek IAP w regulacji apoptozy i przeżycia komórek 167
- Małgorzata Danieluk, Joanna Bandorowicz-Pikuła** — Czy aneksyna VI, białko wiążące wapń i fosfolipidy, jest białkiem G? 177
- Krystian Kaletha, Zygmunt Chodorowski, Gabriela Nagiel-Starczynowska, Magdalena Gazda, Ewa Słomińska** — Czy mutacja genu AMPD, kodującego izoenzym mięśniowej deaminazy AMP u człowieka, może być markerem prognostycznym pierwotnej kardiomiopatii rozstrzeniowej? 182

- Anna Moczarska** — Rola lekkich łańcuchów miozyny w regulacji skurczu mięśnia sercowego 185
- Krystian Kaletha, Zygmunt Chodorowski, Paweł Dutka, Gabriela Nagiel-Starczynowska** — Endoteliny — w dekadę po ich odkryciu 193
- Anna Ostrowska** — Różne efekty działania kinazy białkowej A 202
- Renata Buś, Sławomir Pikuła** — Synapsyny — wewnątrzkomórkowe receptory ATP w procesach wydzielania przekaźników nerwowych 211
- Areta Pankiewicz, Julian Świerczyński** — Zaburzenia budowy i funkcji receptora leptyny — jedna z przyczyn otyłości? . . . 218
- Janusz Błasiak** — Telomeraza i rak. 228
- Janusz Błasiak** — Integryny i ich znaczenie w progresji nowotworów złośliwych . . 239
- Piotr Szymczyk, Zofia M. Kiliańska** — Antygen CD44: czy występowanie jego izoform może mieć znaczenie w diagnostyce nowotworów jelita grubego? 249
- Dorota Nowak, Maria Malicka-Błaszkiwicz** — Izoformy aktyny — zróżnicowanie funkcji w stanach patologicznych 261
- Maciej Kmiecik, Zofia Szweykowska-Kulińska, Artur Jarmołowski** — Transport białek i RNA pomiędzy jądrem komórkowym i cytoplazmą 270
- Magdalena Boncler, Cezary Watała** — Znaczenie trombomoduliny w regulacji krzepnięcia i fibrynolizy 285
- Krzysztof Leśniewicz** — Plazmidy eukariotyczne 293
- Robert Wysocki, Piotr Bobrowicz, Stanisław Ułaszewski** — Mechanizm oporności na związki arsenu u prokariotów i eukariotów 304
- Joanna Pierzynowska, Elżbieta Grzesiuk** — Mutagenność i kancerogenność aflatoksyny AFB₁ 313
- Katarzyna Kuczek, Magdalena Kotowska, Krzysztof Pawlik** — Kombinatoryczna biosynteza makrolidów i innych poliketydów złożonych 320
- Andrzej Jankowski** — Zjawisko indukowanej fluorescencji chlorofilu jako źródło informacji o procesach fotosyntezy zachodzącej w roślinach i stanie środowiska 332

INNE

- Profesor Maria Gumińska — Wspomnienie** 2
- Profesor Kazimierz Kleczkowski — Wspomnienie** 3
- Sprawozdania** 66, 151, 346, 349
- Zasady skracania tytułów czasopism naukowych** 153

Indeks autorów prac przeglądowych, tom 45, 1999

B

- Bandorowicz-Pikuła J** — Pracownia Biochemii Lipidów, Zakład Biochemii Komórki, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN, ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa
- Bania J** — Instytut Biochemii i Biologii Molekularnej Uniwersytetu Wrocławskiego, ul. Tamka 2, 50-137 Wrocław

- Błasiak J** — Katedra Genetyki Molekularnej Uniwersytetu Łódzkiego, ul. Banacha 12/16, 90-237 Łódź
- Bobrowicz P** — Zakład Genetyki, Instytut Mikrobiologii Uniwersytetu Wrocławskiego, ul. Przybyszewskiego 63/77, 51-148 Wrocław
- Bogucka K** — Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN, ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa

Boncler M — Samodzielna Pracownia Zaburzeń Krzepnięcia Krwi Katedry Diagnostyki Laboratoryjnej Akademii Medycznej, ul. Narutowicza 96, 90-141 Łódź

Buś R — Zakład Biochemii Komórki, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN, ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa

C

Chodorowski Z — I Klinika Chorób Wewnętrznych i Zatruc Akademii Medycznej w Gdańsku, ul. Dębinki 7, 80-211 Gdańsk

Cierniewska-Cieślak A — Centrum Mikrobiologii i Wirusologii PAN w Łodzi, ul. Lodowa 106, 93-231 Łódź

Cierniewski C S — Zakład Biofizyki Akademii Medycznej w Łodzi, ul. Lindleya 3, 90-131 Łódź

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

D

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

Dutka P — Katedra i Zakład Biochemii Akademii Medycznej w Gdańsku, ul. Dębinki 1, 80-211 Gdańsk

G

Gazda M — Katedra i Zakład Biochemii Akademii Medycznej w Gdańsku, ul. Dębinki 1, 80-211 Gdańsk

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

Grzesiuk E — Zakład Biologii Molekularnej, Instytut Biochemii i Biofizyki PAN, ul. Pawińskiego 5A, 02-106 Warszawa

H

Hulanicka D — Zakład Biochemii Drobnoustrojów, Instytut Biochemii i Biofizyki PAN, ul. Pawińskiego 5A, 02-106 Warszawa

J

Jankowski A — Uniwersytet Wrocławski, Wydział Chemii, ul. F. Joliot-Curie 14, 50-383 Wrocław

Jarmołowski A — Zakład Ekspresji Genów, Instytut Biologii Molekularnej i Biotechnologii Uniwersytetu im. A. Mickiewicza, ul. Międzychodzka 5, 60-371 Poznań

Jurgowiak M — Katedra i Zakład Biochemii Klinicznej, Akademia Medyczna im. L. Rydygiera, ul. Karłowicza 24, 85-092 Bydgoszcz

Juszczuk M — Zakład Biochemii Drobnoustrojów, Instytut Biochemii i Biofizyki PAN, ul. Pawińskiego 5A, 02-106 Warszawa

K

Kaletha K — Katedra i Zakład Biochemii Akademii Medycznej w Gdańsku, ul. Dębinki 1, 80-211 Gdańsk

Kierzek R — Instytut Chemii Bioorganicznej PAN, ul. Noskowskiego 12/14, 61-704 Poznań

Kiliańska Z M — Zakład Biochemii Medycznej, Katedra Cytobiochemii, Uniwersytet Łódzki, ul. Banacha 12/16, 90-237 Łódź

Kłoszewska M — Instytut Mikrobiologii, Uniwersytet Warszawski, ul. Nowy Świat 67, 00-046 Warszawa

Kmieciak M — Zakład Ekspresji Genów, Instytut Biologii Molekularnej i Biotechnologii Uniwersytetu im. A. Mickiewicza, ul. Międzychodzka 5, 60-371 Poznań

Kotowska M — Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN, ul. Weigla 12, 53-114 Wrocław

Kuczek K — Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN, ul. Weigla 12, 53-114 Wrocław

L

Leśniewicz K — Zakład Biologii Molekularnej Roślin, Instytut Biologii Molekularnej i Biotechnologii Uniwersytetu im. A. Mickiewicza, ul. Międzychodzka 5, 60-371 Poznań

M

Makowska A — Zakład Biochemii Komórki, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN, ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa

Malicka-Błaszkiwicz M — Zakład Patologii Komórki, Instytut Biochemii i Biologii Molekularnej Uniwersytetu Wrocławskiego, ul. Przybyszewskiego 63, 51-148 Wrocław

Małecki M — Zakład Neurofizjologii, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN, ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa

Markiewicz Z — Instytut Mikrobiologii, Uniwersytet Warszawski, ul. Nowy Świat 67, 00-046 Warszawa

Michalik J — Instytut Biochemii i Biofizyki PAN, ul. Pawińskiego 5A, 02-106 Warszawa

Moczarska A — Zakład Biochemii Mięśni, Pracownia Molekularnych podstaw Skurczu Mięśnia, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN, ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa

N

Nagel-Starczynowska G — Katedra i Zakład Biochemii Akademii Medycznej w Gdańsku, ul. Dębinki 1, 80-211 Gdańsk

Niewiadomska G — Zakład Neurofizjologii, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN, ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa

Niewiarowska J — Zakład Biofizyki, Instytut Biochemii i Fizjologii Akademii Medycznej, ul. Lindleya 3, 90-131 Łódź

Nieznański K — Zakład Biochemii Mięśni, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN, ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa

Nowak D — Zakład Patologii Komórki, Instytut Biochemii i Biologii Molekularnej Uniwersytetu Wrocławskiego, ul. Przybyszewskiego 63, 51-148 Wrocław

O

Oliński R — Katedra i Zakład Biochemii Klinicznej, Akademia Medyczna im. L. Rydygiera, ul. Karłowicza 24, 85-092 Bydgoszcz

Ostrowska A — Pracownia Biochemii Ekologii, Instytut Ekologii PAN, ul. Konopnickiej 1, Dziekanów Leśny

P

Pankiewicz A — Katedra i Zakład Biochemii Akademii Medycznej w Gdańsku, ul. Dębinki 1, 80-211 Gdańsk

Pawlik K — Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN, ul. Weigla 12, 53-114 Wrocław

Pawłowska Z — Zakład Biofizyki Akademii Medycznej w Łodzi, ul. Lindleya 3, 90-131 Łódź

Piekiełko A — Zakład Biologii Molekularnej, Instytut Biochemii Uniwersytetu Warszawskiego, ul. Żwirki i Wigury 93, 02-089 Warszawa

Pierzynowska J — Zakład Oceny Żywnienia, Katedra Żywnienia Człowieka SGGW, ul. Nowoursynowska 166, 02-787 Warszawa

Piesterzewicz D — Katedra Genetyki Molekularnej Uniwersytetu Łódzkiego, ul. Banacha 12/16, 90-237 Łódź

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

Polanowski A — Instytut Biochemii i Biologii Molekularnej Uniwersytetu Wrocławskiego, ul. Tamka 2, 50-137 Wrocław

R

Romanowska E — Zakład Fizjologii Roślin, Instytut Botaniki, Uniwersytet Warszawski, ul. Krakowskie Przedmieście 26/28, 00-927 Warszawa

S

Schmidt M — Zakład Wirusologii Molekularnej, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza, ul. Międzychodzka 5, 60-371 Poznań

Słomińska E — Katedra i Zakład Biochemii Akademii Medycznej w Gdańsku, ul. Dębinki 1, 80-211 Gdańsk

Smolarz B — Katedra Genetyki Molekularnej Uniwersytetu Łódzkiego, ul. Banacha 12/16, 90-237 Łódź

Staszczak M — Zakład Biochemii Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej, Plac M. Curie-Skłodowskiej 3, 20-031 Lublin

Szweykowska-Kulińska Z — Zakład Ekspresji Genów, Instytut Biologii Molekularnej i Biotechnologii Uniwersytetu im. A. Mickiewicza, ul. Międzychodzka 5, 60-371 Poznań

Szymczyk P — Zakład Biochemii Medycznej, Katedra Cytobiochemii, Uniwersytet Łódzki, ul. Banacha 12/16, 90-237 Łódź

Szołajska E — Instytut Biologii Wyższej Szkoły Pedagogicznej, ul. Konopnickiej 15, 25-406 Kielce

Ś

Świerczyński J — Katedra i Zakład Biochemii Akademii Medycznej w Gdańsku, ul. Dębinki 1, 80-211 Gdańsk

U

Ułaszewski S — Zakład Genetyki, Instytut Mikrobiologii Uniwersytetu Wrocławskiego, ul. Przybyszewskiego 63/77, 51-148 Wrocław

W

Watała C — Samodzielna Pracownia Zaburzeń Krzepnięcia Krwi Katedry Diagnostyki Laborato-

ryjnej Akademii Medycznej, ul. Narutowicza 96, 90-141 Łódź

Węgrzyn A — Pracownia Biologii Molekularnej Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN afiliowana przy Uniwersytecie Gdańskim, ul. Kładki 24, 80-822 Gdańsk

Węgrzyn G — Katedra Biologii Molekularnej Uniwersytetu Gdańskiego, ul. Kładki 24, 80-822 Gdańsk

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

Wysocki R — Zakład Genetyki, Instytut Mikrobiologii Uniwersytetu Wrocławskiego, ul. Przybyszewskiego 63/77, 51-148 Wrocław

Z

Zagórski-Ostoja W — Zakład Biochemii Drobnoustrojów, Instytut Biochemii i Biofizyki PAN, ul. Pawińskiego 5A, 02-106 Warszawa

Zdunek E — Katedra Biochemii, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego, ul. Rakowiecka 26/30, 02-528 Warszawa

Ziomek K — Instytut Chemii Bioorganicznej PAN, ul. Noskowskiego 12/14, 61-704 Poznań

Cellular & Molecular Biology Letters

Established in 1996

Web site at:

<http://www.microb.uni.wroc.pl/biochem/cmbl.htm>

The Official Publication of the Polish Society for Cell Biology

Editors: J. Szopa, A. Kozubek, A.F. Sikorski

CMBL provides an international forum for original articles (also short communications) and mini-reviews on broad aspects of cell and molecular biology.

Innovation, high scientific quality and originality are the criteria for acceptance of manuscripts after peer-review.

Editorial Office aims to accelerate the review process using fast communication such as electronic mail.

CMBL provides friendly editorial service and low page charges.

Since 1996 CMBL has been included in several internationally accepted databases as:

AGRO-AGEN, BIOSIS, Chemical Abstracts, EMBASE/Excerpta Medica, WinSPIRS, and recently several databases of I.S.I. (Institute for Scientific Information, Philadelphia, PA) - Master Journal List, Biochemistry & Biophysics Citation Index, Science Citation Index Expanded, Biosciences Citation Index, Web of Science and Bioscience Web.

More information related to the journal as well as the access to the abstracts of papers published in all previous issues is available on our web site: <http://www.microb.uni.wroc.pl/biochem/cmbl.htm>

Since 2000 all papers published in CMBL will be available free on-line in full text (PDF format)

Wskazówki dla Autorów

do korespondencji, tytuł artykułu w języku polskim i angielskim oraz – w prawym dolnym rogu: liczbę tabel, rycin, wzorów i fotografii oraz skrócony tytuł pracy, zamieszczany na okładce czasopisma (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 i adresem e-mail oraz wykaz stosowanych skrótów w porządku alfabetycznym.

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 powinny mieć nową, uproszczoną formę. Sposób cytowania czasopism (1), monografii (2), rozdziałów z książek jednotomowych (3), rozdziałów z tomów serii opracowanych przez różnych redaktorów (5) wskazują poniżej podane przykłady.

1. Hildebrandt GR, Aronson NN (1980) *Biochim Biophys Acta* **631**: 499-502
2. Bostock CJ, Summer AT (1978) *The Eucaryotic Chromosome*, Elsevier, North-Holland, Amsterdam
3. Norberth T, Piscator M (1979) W: Friberg L, Nordberg GF Von VB (red) *Handbook on the Toxicology of Metals*. Elsevier, North-Holland, Amsterdam, str. 541-553
4. Delej J, Kesters K (1975) W: Florkin M, Stotz EH (red) *Comprehensive Biochemistry* t 29B. Elsevier, North-Holland, Amsterdam, str. 1-7
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 powinny być zapisane na dyskietce jako: *.tif, lub *.cdr, lub *.psd, lub *.eps. Fotografie czarno-białe (kontrastowe) powinny być wykonane na papierze matowym. Istnieje możliwość wykonania reprodukcji barwnych, ale ich koszty ponoszą Autorzy. Na rycinach nie należy umieszczać opisów słownych, lecz postugiwać się skrótami. Osie wykresów powinny być opatrzone napisem łatwo zrozumiałym. Decyzję o stopniu zmniejszenia ryciny podejmuje wydawca. Ilustracji nie należy włączać w tekst maszynopisu, lecz odpowiednio ponumerować: ryciny noszą cyfry arabskiej, wzory zaś rzymskie. Na marginesie tekstu należy zaznaczyć ołówkiem preferowane miejsce umieszczenia ryciny czy wzoru. 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. Wydruki ilustracji należy na odwrocie podpisać imieniem i nazwiskiem pierwszego z Autorów i pierwszym słowem tytułu pracy oraz oznaczyć „górną-dół” (ołówkiem, na odwrocie). Ze względu na wewnętrzną spójność artykułu wskazane jest konstruowanie oryginalnych rycin i zbiorczych tabel na podstawie danych z piśmiennictwa.

Wydruk i załączniki (w dwu egzemplarzach) oraz dyskietkę, właściwie zabezpieczone przed uszkodzeniem w czasie transportu, prosimy przesłać na adres:

Redakcja kwartalnika „Postępy Biochemii”
Polskie Towarzystwo Biochemiczne
ul. Pasteura 3
02-093 Warszawa

Wydawany przez Polskie Towarzystwo Biochemiczne kwartalnik „Postępy Biochemii” publikuje prace przeglądowe omawiające nowe 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 „Postęпах Biochemii” mogą mieć charakter artykułów monograficznych (do 20 stron tekstu licząc piśmiennictwo i tabele), mini-reviews (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 cytowanego piśmiennictwa. Ujęcie prac winno być syntetyczne, a przedstawione zagadnienia zilustrowane za pomocą tabel, rycin: wykresy, schematy, reakcje, wzory i fotografie.

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 jeśli bywają używane w pracach specjalistycznych. Każda z nadesłanych do Redakcji prac podlega ocenie specjalistów i opracowaniu redakcyjnemu. Redakcja zastrzega sobie możliwość skrócenia tekstu i wprowadzenia zmian nie wpływających na treść pracy, deklaruje też gotowość konsultowania tekstu z Autorami.

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

Redakcja prosi Autorów o przestrzeganie następujących wskazówek szczegółowych:

TEKST: prosimy o nadsyłanie dwóch egzemplarzy wydruku oraz dyskietki z tekstem zapisanym jako *.doc w formacie IBM PC. Wydruk powinien być jednostronny (około 30 wierszy na stronie i około 60 znaków w wierszu), z lewym marginesem około 4 cm. W przypadku stosowania w tekście liter alfabetu greckiego prosimy o wpisanie ołówkiem na marginesie ich fonetycznego brzmienia.

Strona informacyjna jest nienumerowana, zawiera imiona i nazwisko (a) Autora (ów), nazwy, adresy, telefony, adresy e-mail zakładów, w których pracują Autorzy, adres



Pokwitowanie dla wpłacającego

zł

słownie

wpłacający

imię, nazwisko, dokładny adres z kodem pocztowym
na rachunek

Polskie Towarzystwo Biochemiczne
02-093 Warszawa, ul. Pasteura 3
PBK S.A. XIII/O Warszawa
11101053-1225-2720-3-30

stempel

Pobrano opłatę
zł

.....
podpis przyjmującego

Odcinek dla posiadacza rachunku

zł

słownie

wpłacający

imię, nazwisko, dokładny adres z kodem pocztowym
na rachunek

Polskie Towarzystwo Biochemiczne
02-093 Warszawa, ul. Pasteura 3
PBK S.A. XIII/O Warszawa
11101053-1225-2720-3-30

stempel

Pobrano opłatę
zł

.....
podpis przyjmującego

Odcinek dla poczty lub banku

zł

słownie

wpłacający

imię, nazwisko, dokładny adres z kodem pocztowym
na rachunek

Polskie Towarzystwo Biochemiczne
02-093 Warszawa, ul. Pasteura 3
PBK S.A. XIII O Warszawa
11101053-1225-2720-3-30

stempel

Pobrano opłatę
zł

.....
podpis przyjmującego



Pokwitowanie dla wpłacającego

zł

słownie

wpłacający

imię, nazwisko, dokładny adres z kodem pocztowym
na rachunek

Polskie Towarzystwo Biochemiczne
02-093 Warszawa, ul. Pasteura 3
PKO BP VIII O Warszawa
10201084-1791-270-201-111

stempel

Pobrano opłatę
zł

.....
podpis przyjmującego

Odcinek dla posiadacza rachunku

zł

słownie

wpłacający

imię, nazwisko, dokładny adres z kodem pocztowym
na rachunek

Polskie Towarzystwo Biochemiczne
02-093 Warszawa, ul. Pasteura 3
PKO BP VIII O Warszawa
10201084-1791-270-201-111

stempel

Pobrano opłatę
zł

.....
podpis przyjmującego

Odcinek dla poczty lub banku

zł

słownie

wpłacający

imię, nazwisko, dokładny adres z kodem pocztowym
na rachunek

Polskie Towarzystwo Biochemiczne
02-093 Warszawa, ul. Pasteura 3
PKO BP VIII O Warszawa
10201084-1791-270-201-111

stempel

Pobrano opłatę
zł

.....
podpis przyjmującego

Prenumerata P O S T Ę P Ó W
B I O C H E M I I rok 2000
dla nie zrzeszonych w PTBioch 40,00 zł
dla członków PTBioch 20,00 zł
dla zakładów i bibliotek 70,00 zł

Składka P.T.Bioch.
za rok 2000 30,00 zł
studenci 10,00 zł

