

POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE

POSTĘPY BIOCHEMII

PL ISSN
0032-5422

Advances in Biochemistry

TOM 45, NR 1, 1999

| | |
|--|-----------|
| Maria Gumińska — wspomnienie . | 2 |
| Kazimierz Kleczkowski — wspomnienie | 3 |
| Replikacja DNA faga λ. | 5 |
| Ekspresja genów miozyny | 12 |
| Przekazywanie sygnału przez NGF . | 21 |
| Proteoliza | 32 |
| Aktywacja plazminogenu i rak . . | 42 |
| Rodniki tlenowe a karcynogeneza . | 50 |
| Adaptacja błon tylakoidowych . . | 58 |
| Sprawozdania | 66 |

WYDAWCA

Editor
POLSKIE TOWARZYSTWO
BIOCHEMICZNE
Polish Biochemical Society
ul. Pasteura 3
02-093 Warszawa
Poland
tel/fax 658-20-99
Email — ptbioch@nencki.gov.pl

Drukarnia Naukowo-Techniczna
Mińska 65
03-828 Warszawa

REDAKCJA

Editorial Board
REDAKTOR NACZELNY
Editor in chief
ZOFIA ZIELIŃSKA
tel. 831-24-03
REDAKTORZY
Editors
GRAŻYNA PALAMARCZYK
tel. 658-47-02
ANDRZEJ JERZMANOWSKI
tel. 659-70-72 w. 3234
LILIANA KONARSKA
tel. 659-85-71 w. 352
bezp. 658-20-99
wtorki 15—18
ANNA SZAKIEL
tel. 823-20-46
IWONA FIJAŁKOWSKA
tel. 659-70-72 w. 1123
ADAM SZEWCZYK
tel. 659-85-71 w. 269
JOLANTA GRZYBOWSKA
tel. 672-34-38
HANNA ŁASKOWSKA
pon. i czw. 14-16
tel. 659-85-71 w. 441

RECENZENCI ZESZYTU

Referees of this issue
CZESŁAW CIERNIEWSKI
(Łódź)
ADAM DUBIN
(Kraków)
MACIEJ GARSTKA
(Warszawa)
ANDRZEJ KASPRZAK
(Warszawa)
KRZYSZTOF SKOWRONEK
(Warszawa)
MAŁGORZATA SKUP
(Warszawa)
EWA ŚLEDZIEWSKA-GÓJSKA
(Warszawa)

ADRES REDAKCJI

Address
REDAKCJA KWARTALNIKA
„POSTĘPY BIOCHEMII”
POLSKIE TOWARZYSTWO
BIOCHEMICZNE
ul. Pasteura 3
02-093 Warszawa
tel. (22) 659-85-71 w. 441
poniedziałki, czwartki 14⁰⁰-16⁰⁰
fax (22) 822-53-42
e-mail: postepy@nencki.gov.pl

SPIS TREŚCI CONTENTS

| | |
|--|----|
| Profesor Maria Gumińska — Wspomnienie Professor Maria Gumińska — Obituary | 2 |
| Profesor Kazimierz Kleczkowski — Wspomnienie Professor Kazimierz Kleczkowski — Obituary | 3 |
| Regulacja replikacji DNA bakteriofaga λ i plazmidów λ Regulation of replication of λ bacteriophage and λ plasmid DNAs ALICJA WĘGRZYN, GRZEGORZ WĘGRZYN | 5 |
| Regulacja ekspresji genów miozyny mięśniowych ssaków Regulation of mammalian muscle myosin genes expression KRZYSZTOF NIEZNAŃSKI | 12 |
| Drogi przekazywania sygnału przez czynnik wzrostu nerwów (NGF) i jego receptory TrkA i p75^{NTR} Signal transduction of the nerve growth factor (NGF) by TrkA and p75 ^{NTR} receptors GRAŻYNA NIEWIADOMSKA, MACIEJ MAŁECKI | 21 |
| Proteoliza wewnątrzkomórkowa Intracellular proteolysis MAGDALENA STASZCZAK, EDYTA ZDUNEK | 32 |
| Urokinazowy układ aktywacji plazminogenu i jego znaczenie w progresji nowotworów Urokinase plasminogen activation system and its role in cancer progression JANUSZ BŁASIAK, BEATA SMOLARZ, DAGMARA PIETRZENIEWICZ | 42 |
| Rola reaktywnych form tlenu w procesach mutagenезy i karcynogenезy Reactive oxygen species in mutagenesis and carcinogenesis RYSZARD OLIŃSKI, MAREK JURGOWIAK | 50 |
| Adaptacja błon tylakoidowych do zmiennych warunków świetlnych środowiska Adaptation of the thylakoids membranes to environmental light conditions ELZBIETA ROMANOWSKA | 58 |
| Sprawozdania Reports | 66 |

Profesor Maria Gumińska — wspomnienie



1928-1998

Profesor dr hab. med. Maria Gumińska była wieloletnim pracownikiem naukowo-dydaktycznym Instytutu Biochemii Lekarskiej, początkowo Akademii Medycznej, a następnie Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego. Jej działalność naukowa koncentrowała się głównie na zagadnieniach związanych z biochemią nowotworów i chemią kliniczną a kilkanaście ostatnich lat życia poświęciła zagadnieniom ekologicznym związanym z ochroną środowiska.

Maria Gumińska urodziła się 4 stycznia 1928 r. w Zakopanem, w znanej rodzinie nauczycielskiej Zdybów. Dyplom lekarza medycyny otrzymała w 1952 r. na Wydziale Lekarskim Akademii Medycznej w Krakowie gdzie, będąc jeszcze studentką, rozpoczęła pracę jako młodszy asystent w Zakładzie Chemii Fizjologicznej pod kierunkiem Profesora Bolesława Skarżyńskiego. W 1961 r. uzyskała stopień doktora medycyny w tej samej uczelni, w 1968 r. habilitowała się i w 1980 r. otrzymała tytuł profesora nadzwyczajnego, a w 1988 r. profesora zwyczajnego. W tym samym roku

została powołana na stanowisko kierownika Zakładu Biochemii Ogólnej w Instytucie Biochemii Lekarskiej AM, na którym to stanowisku pozostawała do końca swego życia.

Od początku swej działalności naukowej, zwłaszcza po kilkukrotnym pobycie w Instytucie Fibigera w Kopenhadze, Jej badania i zainteresowania koncentrowały się szczególnie na metabolizmie cukrów w komórkach nowotworowych. Szereg prac, opublikowanych wraz ze swymi współpracownikami, poświęciła funkcjonowaniu i właściwościom kinazy pirogranianowej, a zwłaszcza jej izoenzymowi pojawiającemu się podczas transformacji nowotworowej. Opisała również nieznanym przedtem defekt enzymatyczny erytrocytów ludzkich manifestujący się odmianą wrodzonej anemii hemolitycznej. Kilkanaście ważnych i przyjętych z zainteresowaniem prac profesor Maria Gumińska poświęciła toksycznemu działaniu związków fluoru na proces glikolizy w ludzkich erytrocytach oraz w komórkach nowotworu wysiękowego Ehrlicha i hepatomy Morrisa. W tych badaniach wykazała również korzystny wpływ soli magnezu na łagodzenie skutków działania fluorków. Kilka ciekawych prac, zwłaszcza we wczesnym okresie swej działalności poświęciła molekularnemu mechanizmowi działania leków, głównie czynników antykoagulacyjnych.

W ostatniej dekadzie swego życia profesor Maria Gumińska skoncentrowała się szczególnie na problemach ekologicznych w aspekcie ochrony życia ludzkiego przed zgubnym działaniem niektórych czynników środowiskowych. Jej liczne prace, artykuły i ekspertyzy z tej dziedziny, głównie dotyczące toksycznego działania fluorków, metali ciężkich, chlorowcopochodnych węglowodorów i innych czynników wydzielanych do atmosfery i gleby przez zakłady przemysłowe skoncentrowane wokół Krakowa, przysłużyły się znacznie dla kształtowania świadomości ekologicznej i skutecznego przeciwdziałania pojawiającym się w środowisku naturalnym, i mającym negatywny wpływ na zdrowie, zagrożeniom. Dzięki działalności profesor M. Gumińskiej zamknięto m.in. najbardziej toksyczne wydzielanie Huty Aluminium w Skawinie oraz rozwinęto bardziej efektywną działalność Polskiego Klubu Ekologicznego, którego była wiceprzewodniczącą od 1990 r. Za powyższą działalność profesor Maria Gumińska otrzymała szereg nagród i odznaczeń, w tym Złotą Odznakę za pracę dla miasta Krakowa i Ziemi Krakowskiej, Złotą Odznakę za zasługi dla Ochrony Środowiska i Gospodarki Wod-

nej. Nagrodę Fundacji Alfreda Jurzykowskiego w Nowym Jorku oraz Krzyż Orderu Odrodzenia Polski. Z ramienia Klubu Ekologicznego uczestniczyła w specjalistycznych konferencjach międzynarodowych w Szwecji, USA, Brazylii i Japonii.

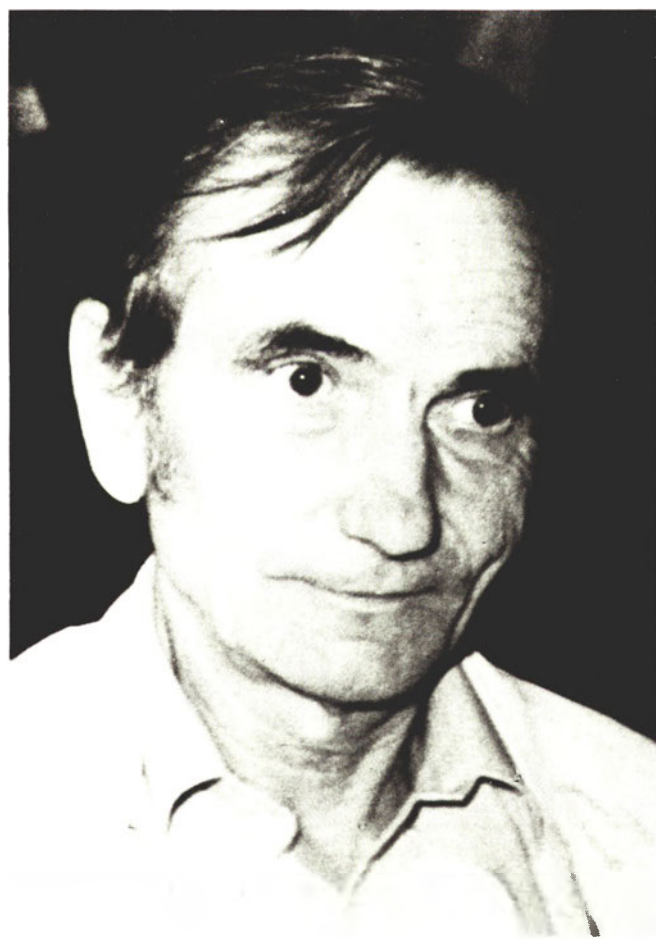
Profesor Maria Gumińska była wysoko cenionym nauczycielem akademickim i wychowawcą młodej kadry. Od 1972 r. wykładała biochemię i chemię kliniczną na Wydziale Farmacji, a w latach 1981-1984 pełniła na nim funkcję prodziekana. Spośród swoich współpracowników wypromowała dziewięciu doktorów i przeszkoliła liczne grono pracowników laboratoriów klinicznych, z różnych ośrodków w kraju. Wspólnie ze współpracownikami opublikowała ponad 140 prac doświadczalnych oraz kilkadziesiąt artykułów

popularnonaukowych, skryptów i podręczników studenckich. Przez z górą 40 lat systematycznie pracowała przy stole laboratoryjnym poświęcając cały swój czas, a nawet życie rodzinne, ulubionej dziedzinie nauki — biochemii. Przez wiele lat była również zaangażowana w pracy społecznej, która przyniosła Krakowowi i krajowi konkretne wyniki w zakresie ochrony środowiska.

Profesor Maria Gumińska odeszła niespodziewanie 6 lutego 1998 roku w pełni sił twórczych i planów na przyszłość. Pozostanie w naszej pamięci jako człowiek niezwykle pracowity, prawy, głęboko religijny i bez reszty oddany ochronie zdrowia i życia ludzkiego.

Włodzimierz S. Ostrowski

Profesor Kazimierz Kleczkowski — wspomnienie



1924-1998

Z głębokim smutkiem zawiadamiamy, że w dniu 8 sierpnia 1998 roku zmarł w Warszawie Profesor doktor habilitowany Kazimierz Kleczkowski, współtwórca Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN, wybitny biochemik, uznany specjalista w dziedzinie biologii molekularnej roślin.

Profesor Kleczkowski rozpoczynał swą drogę naukową we wczesnych latach powojennych, wkrótce po demobilizacji z I-ej Armii Wojska Polskiego, w szeregach której brał udział w walkach na frontach II-ej wojny światowej. Za waleczność i odwagę został On uhonorowany wieloma medalami i odznaczeniami wojennymi. W roku 1953 ukończył studia wyższe na Wydziale Rolniczym Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego (SGGW), uzyskując stopień magistra inżyniera rolnictwa ze specjalizacją Technologii Rolno-Spożywczej. Bezpośrednio po studiach podjął pracę dydaktyczną i badawczą w Katedrze Biochemii SGGW, by w roku 1954 rozpocząć 4-letnie studia doktoranckie pod kierunkiem Profesora Ignacego Reifera w nowopowstającym Instytucie Biochemii i Biofizyki PAN (IBB PAN), w organizowaniu którego brał czynny udział i z którym był nieprzerwanie związany do końca swoich dni, przechodząc przez kolejne szczeble kariery naukowej. Od 1954 roku przez blisko dwie dekady zainteresowania Profesora Kleczkowskiego skupiały się na badaniach dotyczących występowania enzymów cyklu ornitynowego w roślinach wyższych, dzięki czemu zdobył sobie pionierską pozycję w tej dziedzinie biochemii roślin. Wyniki tych badań były kolejno przedmiotem zarówno Jego pracy doktorskiej, jak i rozprawy habilitacyjnej. Stopień doktora nauk przyrodniczych otrzymał w 1958 roku, zaś doktora habilitowanego w 1964 roku.

W roku 1965 został powołany na stanowisko docenta, obejmując kierownictwo Pracowni Metabolizmu Związków Azotowych, a w roku 1969 otrzymał nominację na stanowisko Kierownika Zakładu Biochemii Roślin IBB PAN. W roku 1971 uzyskał tytuł profesora nadzwyczajnego, a w roku 1978 profesora zwyczajnego. Obok badań nad cyklem ornitynowym u roślin, zainteresowania naukowe Profesora Kleczkowskiego

dotyczyły poznania mechanizmów hormonalnej regulacji ekspresji genomu roślinnego, a także — w ostatnim okresie — prób uzyskania roślin transgenicznych posiadających ulepszone cechy użytkowe — problemu niezwykle aktualnego we wspólnej biologii molekularnej roślin.

Podczas swej wieloletniej pracy badawczej Profesor Kleczkowski nawiązał bliską współpracę z wieloma uznanymi ośrodkami naukowymi na świecie. Jako stypendysta Fundacji im. J. D. Rockefellera, a także Fundacji im. A. Humboldta odbył długoterminowe staże naukowe na Uniwersytecie Wisconsin, Madison (Prof. P. P. Cohen), Uniwersytecie w Marburgu (Prof. Kating) oraz w Instytucie Hodowli Tkanek im. M. Plancka w Kolonii (Prof. J. Schell), a także jako profesor wizytujący odwiedził m.in. Uniwersytet im. Goethego we Frankfurcie nad Menem, Uniwersytet Harvarda w Bostonie, Uniwersytety w Tokio, Kalkucie i Bombaju oraz wiele innych. Na Jego dorobek naukowy składa się ponad 100 prac eksperymentalnych oraz 12 artykułów przeglądowych i monografii ogłoszonych w uznanych czasopismach krajowych i zagranicznych. Wychował liczną rzeszę biochemików

i biologów molekularnych roślin, był promotorem 11-tu przewodów doktorskich oraz inspiratorem 5-ciu rozpraw habilitacyjnych. Był członkiem Rad Naukowych szeregu Instytutów Polskiej Akademii Nauk, a przez 35 lat nieprzerwanie był członkiem Rady Naukowej IBB, PAN, wchodząc w skład lub przewodnicząc wielu komisjom naszej Rady. Profesor Kleczkowski pełnił przez 2 kadencje (1978-83) funkcję zastępcy Sekretarza Wydziału Nauk Biologicznych PAN, a także był naczelnym Dyrektorem naszego Instytutu (1987-90). Położył On wielkie zasługi w budowie nowej siedziby IBB PAN.

Profesor Kleczkowski był Osobą niezwykle przyjazną i życzliwą ludziom. Każdy z Jego współpracowników zawsze mógł liczyć na zrozumienie i pomoc w chwilach trudnych, wymagających Jego autorytetu, czy po prostu wsparcia duchowego.

Odchodząc nazbyt wcześnie pozostawił w żałobie wielkie grono przyjaciół i współpracowników, którzy pamięć o Nim zachowają na zawsze z szacunkiem i wdzięcznością.

Uczniowie, Współpracownicy i Przyjaciele

Errata

W zeszycie 3 tomu 44 z 1998 roku w artykułach autorstwa Iwo Bohra i Jadwigi Gniot-Szulżyckiej oraz Marty Bobeszko i Jolanty Barańskiej błędnie zapisano termin FOSFATAZA.

Za niedopatrzenie Redakcja przeprasza Autorów i Czytelników.

Regulacja replikacji DNA bakteriofaga λ i plazmidów λ Regulation of replication of λ bacteriophage and λ plasmid DNAsALICJA WĘGRZYN¹,
GRZEGORZ WĘGRZYN²

Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Replikacja DNA w cyklu życiowym bakteriofaga λ
- III. Plazmidy λ
- IV. Biochemiczny mechanizm inicjacji replikacji z *ori λ*
- V. Regulacja replikacji plazmidów λ w komórkach *E-scherichia coli*
- VI. Regulacja przełączenia replikacji typu θ w replikację typu σ podczas rozwoju bakteriofaga λ
- VII. Mechanizm rozpadu kompleksu replikacyjnego λ
- VIII. Replikacja plazmidów λ w cyklu komórkowym *E-scherichia coli*
- IX. Uwagi końcowe

Contents:

- I. Introduction
- II. DNA replication in the life cycle of bacteriophage λ
- III. λ plasmids
- IV. Biochemical mechanism of initiation of replication from *ori λ*
- V. Regulation of λ plasmid replication in *Escherichia coli*
- VI. Regulation of the switch from θ replication to σ replication during bacteriophage λ development
- VII. Mechanism of disassembly of bacteriophage λ replication complex
- VIII. Replication of λ plasmids in *Escherichia coli* cell cycle
- IX. Concluding remarks

I. Wstęp

Bakteriofag λ odegrał znaczącą rolę w rozwoju biologii molekularnej jako podstawowy model badawczy [1]. Badania procesów zachodzących w trakcie rozwoju tego faga w komórkach *Escherichia coli* pozwoliły na poznanie molekularnych podstaw takich procesów jak aktywacja i represja inicjacji transkrypcji, antyterminacja transkrypcji, udział białek szoku termicznego w tworzeniu odpowiedniej struktury makromolekuł a także inicjacja replikacji DNA [2]. Uzyskane wyniki miały także znaczenie praktyczne, gdyż zmodyfikowane fagi lub elementy genomu λ są obecnie szeroko wykorzystywane jako narzędzia w inżynierii genetycznej [2]. Aktualnie mimo dużego postępu w badaniach nad znacznie bardziej skomplikowanymi organizmami fag λ jest w dalszym ciągu ważnym modelem badawczym w biologii molekularnej.

Jak wspomniano wyżej, jednym z procesów, w badaniu których bakteriofag λ stał się podstawowym modelem doświadczalnym jest replikacja DNA. Podczas rozwoju w zakażonej komórce gospodarza, któ-

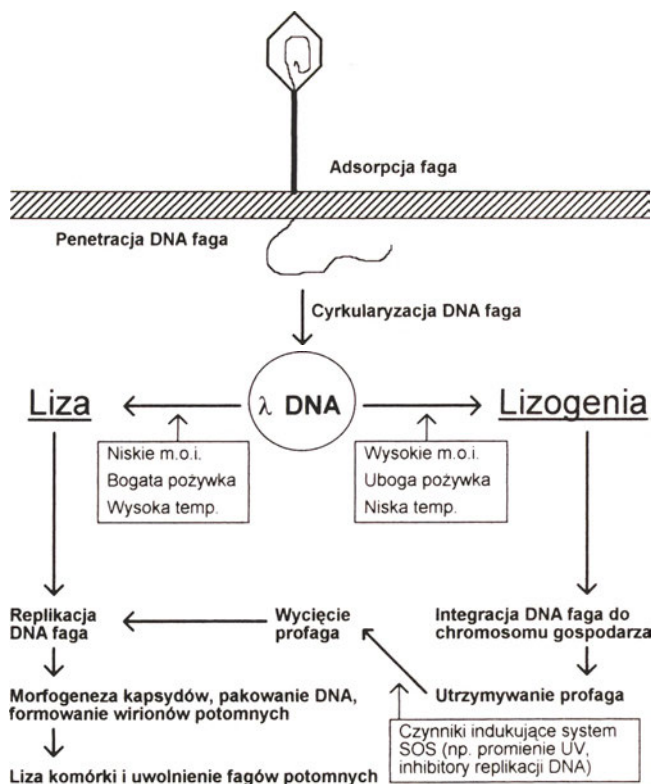
rym jest bakteria *E. coli*, do replikacji materiału genetycznego wirusa wykorzystywane są zarówno produkty dwóch genów fagowych (*O* i *P*) jak i komórkowe białka replikacyjne. Enzymologia replikacji DNA *E. coli* jak i współdziałanie białek fagowych i bakteryjnych w replikacji DNA bakteriofaga λ były przedmiotem niedawno opublikowanych artykułów przeglądowych [3, 4] i są w tej pracy przedstawione jedynie bardzo ogólnie. Skoncentrowaliśmy się natomiast na molekularnych mechanizmach warunkujących precyzyjną regulację inicjacji replikacji DNA bakteriofaga λ oraz plazmidów pochodzących od tego faga (tak zwanych plazmidów λ) w komórkach *E. coli*.

II. Replikacja DNA w cyklu życiowym bakteriofaga λ

Po zakażeniu komórki *E. coli* rozwój faga λ może przebiegać na dwa alternatywne sposoby (szczegółowe informacje na ten temat zawarte są w ostatnio opublikowanych pracach przeglądowych [2, 5]). Rozwój lityczny prowadzi do replikacji DNA wirusa, ekspresji większości jego genów, utworzenia wirionów potomnych oraz ich uwolnienia po lizie komórki gospodarza. Alternatywną drogą rozwojową jest cykl lizogeniczny polegający na integracji DNA faga do genomu gospodarza i jego przejście w stadium profaga. W tej postaci materiał genetyczny faga jest replikowany wraz

¹ Dr, Pracownia Biologii Molekularnej Instytutu Biochemii i Biofizyki Polskiej Akademii Nauk afiliowana przy Uniwersytecie Gdańskim, ul. Kładki 24, 80-822 Gdańsk

² prof. dr hab., Katedra Biologii Molekularnej Uniwersytetu Gdańskiego, ul. Kładki 24, 80-822 Gdańsk



Ryc. 1. Schemat rozwoju bakteriofaga λ w komórkach *Escherichia coli*. Po adsorpcji faga na komórce bakteryjnej i wnikięciu jego materiału genetycznego do wnętrza komórki następuje cyrkularyzacja DNA wirusa. Dalszy rozwój faga zależy od warunków środowiskowych i fizjologii komórki gospodarza. Bogata pożywka, stosunkowo wysoka temperatura oraz zakażenie jednej komórki średnio jednym fagiem (niska wielokrotność zakażenia, czyli niskie m.o.i.) sprzyjają rozwojowi litycznemu, podczas którego następuje replikacja DNA faga, synteza białek strukturalnych, morfogeneza wirionów potomnych i ich uwolnienie po lizie komórki gospodarza. W warunkach głodowych, stosunkowo niskiej temperaturze oraz przy zakażeniu jednej komórki wieloma fagami (wysokiej wielokrotności zakażenia, czyli wysokim m.o.i.) preferowany jest cykl lizogenny, podczas którego genom faga zostaje włączony do chromosomu bakteryjnego i jest biernie replikowany wraz z nim. Czynniki stresowe (takie jak np. promieniowanie UV) mogą spowodować indukcję profaga i przejście wirusa w cykl lityczny.

z chromosomem bakteryjnym a ekspresja większości genów wirusa jest zahamowana (Ryc. 1).

Jeżeli wybrana zostaje lityczna droga rozwoju bakteriofaga λ jednym z najważniejszych procesów jest replikacja DNA wirusa. Po infekcji komórki *E. coli* DNA faga replikuje się najpierw według modelu θ (z jednej kolistej cząsteczki powstają dwie koliste cząsteczki potomne), a następnie po około 15 minutach od momentu infekcji przechodzi w replikację typu σ (czyli replikację według modelu toczonego koła). Produktami tego typu replikacji są długie konkatameryczne

Ryc. 2. Mapa genetyczna genomu bakteriofaga λ oraz typowego plazmidu λ . Skala podana jest w tysiącach par zasad (kb). Zaznaczono rejony genomu faga zawierające geny, których funkcja jest niezbędna w poszczególnych etapach cyklu życiowego wirusa; wskazano także położenie niektórych genów. Główne transkrypty zaznaczone są strzałkami (kierunek strzałki oznacza kierunek transkrypcji). Terminatory oznaczone są krótkimi pionowymi kreskami.

cząsteczki DNA, które następnie są cięte na odcinki odpowiadające jednostkom genomu faga i pakowane do równocześnie powstających główek fagowych. W wyniku tego powstają wiriony potomne, które po działaniu fagowych białek lizy opuszczają komórkę gospodarza.

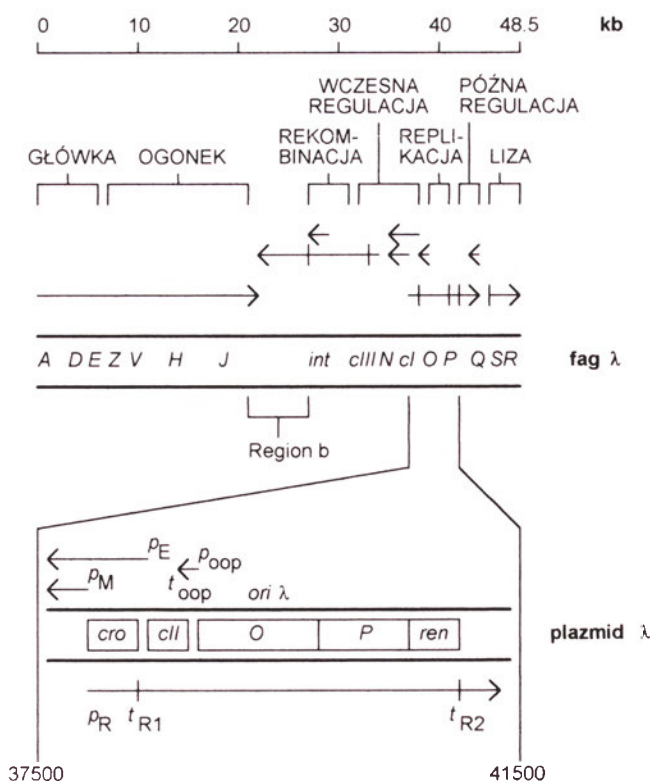
III. Plazmidy λ

Fragment genomu faga λ obejmujący wszystkie geny i sekwencje regulatorowe niezbędne do replikacji może być wycięty i po cyrkularyzacji replikuje się w komórkach *E. coli* jako plazmid, który zwany jest plazmidem λ . W odróżnieniu od genomu faga λ , plazmidy od niego pochodzące replikują się wyłącznie według modelu θ [6]. Plazmidy te są zatem bardzo wygodnymi modelami w badaniach nad replikacją DNA (Ryc. 2).

Ponieważ plazmidy λ utrzymują się w stałej liczbie kopii na komórkę (w zależności od warunków wzrostu komórek gospodarza, takich jak rodzaj pożywki i temperatura, od 20 do 50 [2, 6]), muszą istnieć mechanizmy kontrolujące częstość inicjacji replikacji tych plazmidów w komórce, tak aby jedna cząsteczka replikowała się średnio raz podczas jednego cyklu komórkowego.

IV. Biochemiczny mechanizm inicjacji replikacji z *ori λ*

Do inicjacji replikacji DNA faga i plazmidu λ , rozpoczynającej się w rejonie *ori λ* położonym w obrębie genu *O*, konieczne są kodowane przez faga białka



O i P oraz szereg białek gospodarza. Pierwszym etapem tworzenia się kompleksu replikacyjnego w obrębie sekwencji *ori λ* jest wiązanie się białka O z czterema 19-nukleotydowymi sekwencjami (zwanymi iteronami) i utworzenie nukleoproteinowej struktury zwanej O-somem [7].

Kolejnym etapem tworzenia kompleksu replikacyjnego λ jest przyłączenie się do O-somu białek P i DnaB. Białko P może oddziaływać z białkiem λ O [8], jednak do O-somu wiąże się kompleks białek P·DnaB [9]. Ponieważ białko P jest równocześnie silnym inhibitorem aktywności helikazy DnaB [10-13], powstały kompleks *ori λ* ·O·P·DnaB, mimo że jest stabilną strukturą, nie może przeprowadzać kolejnego etapu inicjacji replikacji — rozwijania dwuniciowej struktury DNA i tworzenia widełek replikacyjnych [9, 14, 15].

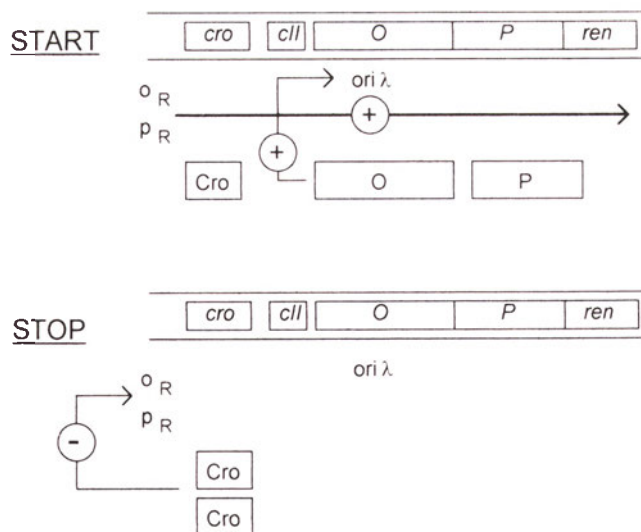
Następne etapy inicjacji replikacji DNA λ , po powstaniu nukleoproteinowego kompleksu *ori λ* ·O·P·DnaB, wymagają funkcji białek szoku termicznego DnaK, DnaJ i GrpE [16]. Dzięki ich działaniu możliwe staje się przekształcenie kompleksu *ori λ* ·O·P·DnaB w taki sposób, że helikaza DnaB zostaje uwolniona od hamującego jej aktywność białka P [14, 17, 18].

Kolejnym etapem inicjacji replikacji DNA λ jest rozwijanie dwuniciowej struktury DNA przez helikazę DnaB. Reakcja rozwijania DNA rozpoczyna się od *ori λ* . Odbywa się ona jedynie w przypadku cząsteczek DNA będących w formie superzwiniętej [14]. Do efektywnego rozwijania DNA konieczna jest także funkcja gyrazy DNA. Wiąże się to z pojawianiem się bariery energetycznej wynikającej z utworzenia pozytywnych superskętów przed widełkami replikacyjnymi w wyniku rozplatania DNA [14]. Po lokalnym rozwinięciu DNA możliwa jest stabilizacja odcinków jednoniciowych przez białka SSB oraz tworzenie primerów wykorzystywanych następnie przez polimerazę DNA III [16, 19].

V. Regulacja replikacji plazmidów λ w komórkach *Escherichia coli*

Ze względu na to, że plazmidy λ zawierają rejon replikacyjny DNA faga λ obejmujący wszystkie geny i sekwencje sygnałowe niezbędne do inicjacji replikacji, a ponadto są one stosunkowo małymi replikonami, ogromna większość danych na temat regulacji replikacji DNA λ pochodzi z badań właśnie nad tymi plazmidami. Do niedawna powszechnie akceptowany był model regulacji replikacji plazmidów λ zaproponowany przez M a t s u b a r ę [20] i przedstawiony schematycznie na rycinie 3.

Według tego modelu zasadniczą rolę w kontroli częstości inicjacji replikacji odgrywa wiązanie się białka inicjatorowego O do rejonu *ori λ* oraz autoregulacyjna pętla represora Cro. Wcześniej pokazywano, że białko O jest bardzo niestabilne *in vivo* [21, 22],



Ryc. 3. Schemat regulacji replikacji plazmidów λ w komórkach *Escherichia coli* zaproponowany przez M a t s u b a r ę [20]. Transkrypcja z promotora p_R powoduje powstanie mRNA dla syntezy białek replikacyjnych i represora Cro oraz działa jako aktywacja transkrypcyjna *ori λ* . Związanie się białka O z rejonem *origin* jest pierwszym etapem inicjacji replikacji DNA (START). Ponieważ równocześnie zwiększa się stężenie represora Cro, transkrypcja z promotora p_R , a zatem także inicjacja nowych rund replikacji DNA, zostaje zahamowana (STOP) aż do momentu rozcieńczenia represora w wyniku wzrostu objętości komórki.

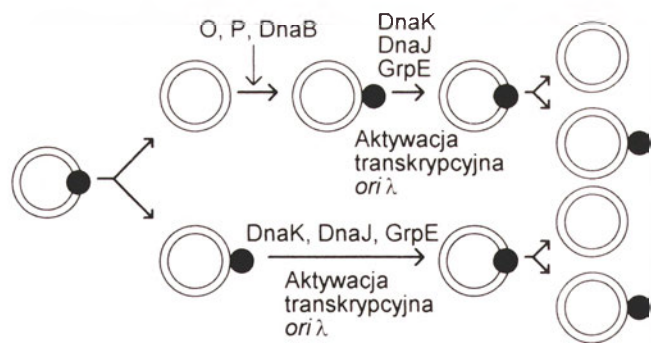
zatem sądzono, że po inicjacji białko to jest szybko degradowane i do następnej rundy replikacji konieczna jest synteza nowej puli białka O. Synteza białka O może zachodzić tylko wtedy gdy aktywny jest promotor p_R (Ryc. 2 i 3). Jest on reprimowany przez produkt genu *cro*, gdy obecny jest on w stosunkowo dużym stężeniu w komórce. Wzrost objętości komórki w trakcie cyklu komórkowego powoduje zmniejszenie stężenia represora Cro, odblokowanie promotora p_R , syntezę białka O i inicjację replikacji plazmidu. Jednocześnie następuje transkrypcja genu *cro* i synteza nowej puli represora co prowadzi do ponownej represji promotora p_R . Gdy proponowano ten model, wiadomo było także, że transkrypcja rozpoczynająca się z promotora p_R jest niezbędna w replikacji DNA plazmidu λ nie tylko w celu produkcji mRNA genów replikacyjnych, lecz również w procesie tzw. aktywacji transkrypcyjnej *origin* czyli aktywnej transkrypcji przebiegającej w rejonie inicjacji replikacji DNA [23]. Mimo iż wiadano, że aktywacja transkrypcyjna *ori λ* jest niezbędna w replikacji DNA λ , to jednak w owym czasie procesowi temu nie przypisywano roli regulacyjnej.

Wyżej opisany model regulacji replikacji plazmidów λ był prosty, elegancki i został powszechnie zaakceptowany. Jednakże prace rozpoczęte przed kilkoma laty wykazały, że nie może on być uznany jako główny mechanizm kontrolujący częstość inicjacji replikacji z *ori λ* . Badając replikację plazmidów λ w komórkach *E. coli* w warunkach głodu aminokwasowego, gdy synteza większości białek, w tym białka O, była zahamowana, stwierdzono, że plazmidy λ replikują się w dalszym ciągu jeśli możliwa jest transkrypcja [24,

25]. Zjawisko takie zachodziło w głodzonych mutantach *relA*⁻. Replikacja ta była zależna od funkcji białka O [25, 26], co wskazywało, że inicjacja replikacji z *oriλ* jest możliwa bez syntezy nowych cząsteczek tego białka. Dalsze badania potwierdziły, że białko O jest szybko degradowane w komórkach *E. coli*, ale tylko wtedy gdy znajduje się w stanie wolnym w cytoplazmie [27]. Wykazano jednocześnie obecność frakcji stabilnego białka O, która okazała się być złożona z cząsteczek tego białka zawartych w kompleksie replikacyjnym i chronionych przed proteolizą przez inne elementy tego kompleksu [27, 28]. Dokładne badania kinetyki syntezy DNA oraz doświadczenia pozwalające śledzić losy replikujących się cząsteczek DNA w komórkach doprowadziły do wniosku, że replikacja plazmidów λ zachodząca bez syntezy nowych cząsteczek białka O odbywa się w oparciu o kompleksy replikacyjne utworzone przed głodzeniem i dziedziczone po każdej rundzie replikacji przez jedną z dwu potomnych kopii plazmidowych [26, 29].

Powyższe wyniki podważały zasadność modelu Matsubary (Ryc. 3). Ponadto, w warunkach odpowiedzi rozluźnionej (czyli w głodzonych mutantach *relA*⁻) synteza represora Cro nie może zachodzić, co dodatkowo wskazywało na inną regulację replikacji plazmidów λ niż poprzednio zaproponowana. Co zatem jest głównym regulatorem częstości inicjacji replikacji z *oriλ*? Replikacja plazmidów λ może zachodzić podczas odpowiedzi rozluźnionej (w głodzonych mutantach *relA*) jest natomiast zahamowana podczas odpowiedzi ściślej (w głodzonych szczepach *relA*⁺). Wykazano, że zahamowanie to jest wynikiem znacznie obniżonej aktywności promotora *p_R* w tych warunkach [30-32]. Wyniki te zwróciły uwagę na rolę aktywacji transkrypcyjnej *oriλ* jako potencjalnego czynnika regulującego replikację.

Kolejnym etapem badań było stwierdzenie czy proces replikacji plazmidów λ oparty o dziedziczony kompleks replikacyjny zachodzi jedynie w głodzonych komórkach czy jest on zjawiskiem występującym także w normalnych warunkach wzrostu, oraz czy szybki rozpad białka O ma znaczenie regulacyjne w tych warunkach. Już pierwsze badania wykazały, że zarówno brak jak i nadmiar proteazy ClpXP (która degraduje białko O) nie wpływają ani na replikację plazmidów λ ani na rozwój lityczny bakteriofaga λ [33]. Zatem szybka proteoliza białka O nie ma istotnego znaczenia w kontroli replikacji DNA λ. Dokładniejsze badania udowodniły, że replikacja plazmidów λ oparta o dziedziczony kompleks replikacyjny zachodzi także w komórkach rosnących w bogatych pożywkach — zjawisko to nazwane zostało „dziedziczeniem białka” [34]. Ostatnio wykazano, że zarówno w głodzonych komórkach jak i w normalnych warunkach wzrostu nie ma preferencji w dziedziczeniu kompleksu replikacyjnego przez żadną z potomnych kopii plazmidowych — zarówno potomna cząsteczka posiadająca rodzicielską nić *l* jak i cząsteczka niosąca



Ryc. 4. Schemat replikacji plazmidów λ zakładający dwie „drogi” replikacji. Po każdej rundzie replikacji, kompleks replikacyjny (zaczernione kółko) jest dziedziczony przez jedną z dwóch potomnych kopii plazmidowych. Na cząsteczce pozbawionej kompleksu replikacyjnego musi utworzyć się nowy kompleks z udziałem kodowanych na plazmidzie białek O i P oraz białek bakteryjnych (w tym helikazy DnaB). Do rozpoczęcia replikacji zarówno przez kompleks dziedziczony jak i nowo powstały konieczna jest aktywacja transkrypcyjna *oriλ* oraz funkcja białek szoku termicznego DnaK, DnaJ i GrpE.

rodzicielską nić *r* mogą z równym prawdopodobieństwem dziedziczyć kompleks replikacyjny [35].

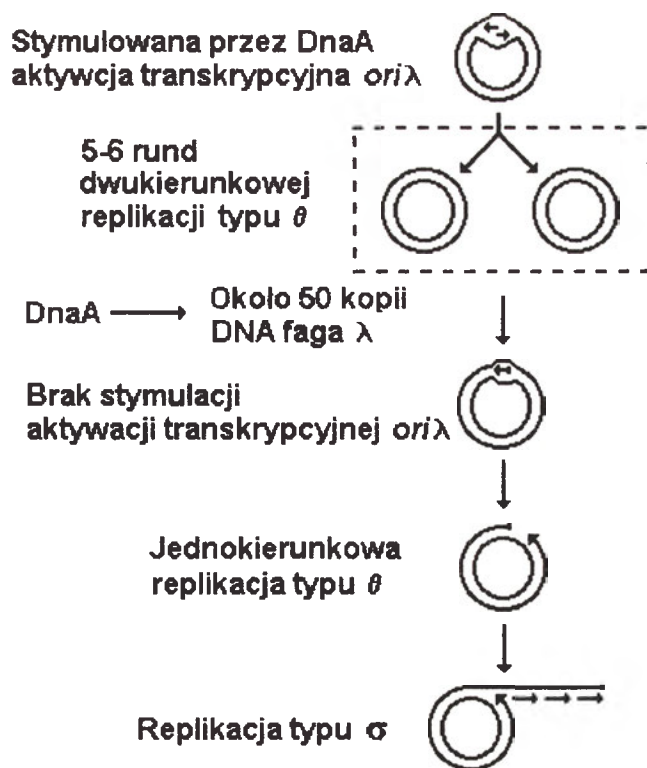
Zaproponowano dwie „drogi” replikacji plazmidów λ w komórkach *E. coli*: jedna oparta o funkcjonowanie dziedziczony kompleks replikacyjny i druga, podczas której nowe kompleksy replikacyjne muszą być utworzone z nowo syntetyzowanych białek replikacyjnych (Ryc. 4). Badania genetyczne sugerują jednak, że utworzenie kompleksu replikacyjnego nie jest sygnałem do rozpoczęcia replikacji [34-38]. Kompleks *oriλ*·O·P·DnaB musi zostać przekształcony przez białka szoku termicznego DnaK, DnaJ i GrpE a reakcja ta wydaje się być sprzężona z aktywacją transkrypcyjną *oriλ* i czasowym rozdzieleniem nici DNA. Dzięki temu możliwe jest prawidłowe umiejscowienie kompleksu replikacyjnego w rejonie *origin* [29, 36, 37]. Obecnie najbardziej prawdopodobna i jednocześnie najatrakcyjniejsza hipoteza zakłada, że sygnałem do rozpoczęcia replikacji plazmidu λ jest aktywacja transkrypcyjna *oriλ* [6].

Jeżeli hipotezę o decydującej roli aktywacji transkrypcyjnej *oriλ* w regulacji replikacji plazmidów λ uznać za prawdziwą, to transkrypcja rozpoczynająca się z promotora *p_R* i przechodząca przez rejon *origin* powinna być bardzo precyzyjnie regulowana. Wcześniej zaznaczyliśmy już, że represor Cro nie odgrywa znaczącej roli w regulacji replikacji plazmidów λ w głodzonych komórkach [25, 26]. Ostatnio skonstruowano plazmidy λ pozbawione całkowicie funkcji *cro* (*λcro*-null). Plazmidy te są stabilnie utrzymywane w komórkach *E. coli* wykazując zwiększoną w porównaniu do plazmidów *λcro*⁺, lecz stałą liczbę kopii na komórkę [39]. Wyniki te świadczą o tym, że w przeciwieństwie do modelu Matsubary (Ryc. 3) represor Cro nie odgrywa kluczowej roli w replikacji plazmidów λ. Oczywiście produkt genu *cro* jest represorem promotora *p_R* i jego inaktywacja powoduje większą częstość inicjacji transkrypcji, a zatem pośrednio większą liczbę

kopii plazmidu λ w komórce, jednak wahania stężenia białka Cro w cyklu komórkowym nie są tak duże lub nie mają tak dużego znaczenia jak uprzednio sądzono. Pojawiło się zatem pytanie: co jest czynnikiem regulującym aktywność promotora p_R , a zatem pośrednio efektywność aktywacji transkrypcyjnej $ori\lambda$ i inicjacji replikacji plazmidu λ ? Niespodziewanie okazało się, że aktywność promotora p_R jest obniżona w komórkach *E. coli* przy braku funkcji genu *dnaA* [40]. Fakt ten mógł wytłumaczyć obserwacje, że plazmidy λ nie mogą replikować się w niektórych mutantach *dnaA* [41, 42]. Pojawiła się zatem atrakcyjna hipoteza, że białko DnaA, które w komórce spełnia rolę inicjatora replikacji DNA chromosomu, również reguluje częstość inicjacji replikacji plazmidów λ poprzez stymulację aktywacji transkrypcyjnej $ori\lambda$. Ostatnio wykazano, białko DnaA działa w tym procesie bezpośrednio (a nie poprzez regulację aktywności hipotetycznego genu, który wpływałby na aktywność p_R), gdyż może ono stymulować transkrypcję z promotora p_R *in vitro* [43]. Badania te pozwoliły na zaproponowanie stymulowanej przez białko DnaA aktywacji transkrypcyjnej $ori\lambda$ jako głównego procesu kontrolującego częstość inicjacji replikacji plazmidów λ .

VI. Regulacja przełączenia replikacji typu θ w replikację typu σ podczas rozwoju bakteriofaga λ

Replikacja DNA faga λ krótko po zakażeniu komórki gospodarza zachodzi według modelu dwukierunkowej replikacji typu θ , a następnie przechodzi w replikację typu σ (według modelu „toczącego się koła”). Akceptowany obecnie model zakłada, że w przeciwieństwie do zachodzącej we wczesnych etapach rozwoju faga dwukierunkowej replikacji typu θ , jednokierunkowa replikacja θ może przechodzić w replikację σ dzięki odepchnięciu końca 5' przez rosnący koniec 3' nowo syntetyzowanej nici [14]. Badania *in vitro* wykazały, że bez aktywności polimerazy RNA replikacja DNA λ zachodzi jednokierunkowo, natomiast transkrypcja rejonu *origin* powoduje pojawienie się struktur DNA replikujących się dwukierunkowo [44]. Można zatem przypuszczać, że białko DnaA poprzez stymulację promotora p_R ma istotny wpływ na kierunkowość replikacji DNA faga λ . Zapewne we wczesnej fazie infekcji białko DnaA stymuluje aktywację transkrypcyjną $ori\lambda$ co prowadzi do dwukierunkowej replikacji typu θ , natomiast pojawienie się wielu kopii DNA faga λ w komórce powoduje wymiarczkowanie białka DnaA, a brak stymulacji promotora p_R doprowadza do jednokierunkowej replikacji typu θ przechodzącej w replikację typu σ . Potwierdzeniem tej hipotezy może być fakt, że w mutantach *dnaA* zakażonych fagiem λ obserwowano struktury replikacyjne typu σ już we wczesnych etapach infekcji [45]. Dodatkowo wykazano, że w genomie faga λ istnieje wiele sekwencji wiążących białko DnaA [46], co jeszcze bardziej



Ryc. 5. Schemat regulowanego przez białko DnaA przełączenia replikacji typu θ w replikację typu σ podczas rozwoju faga λ . W pierwszych etapach rozwoju komórkowe białko DnaA stymuluje aktywację transkrypcyjną $ori\lambda$ co umożliwia dwukierunkową replikację typu θ . W wyniku kilku (5-6) rund takiej replikacji powstaje około 50 kopii DNA faga λ . Sekwencje wiążące białko DnaA obecne w DNA λ powodują wymiarczkowanie tego białka, co uniemożliwia stymulację aktywacji transkrypcyjnej $ori\lambda$. W takich warunkach rozpoczyna się jednokierunkowa replikacja typu θ , która po jednej rundzie przechodzi w replikację typu σ w wyniku odepchnięcia końca 5' przez rosnący koniec 3' nowo syntetyzowanej nici. Dla uproszczenia schematu pokazano jedynie nić DNA syntetyzowaną w sposób ciągły podczas replikacji.

przemawia za możliwością wymiarczkowania tego białka przez szybko rosnącą liczbę kopii DNA bakteriofaga w wyniku kilku rund replikacji typu θ . Schemat regulowanego przez białko DnaA przełączenia replikacji θ w replikację σ przedstawia rycina 5.

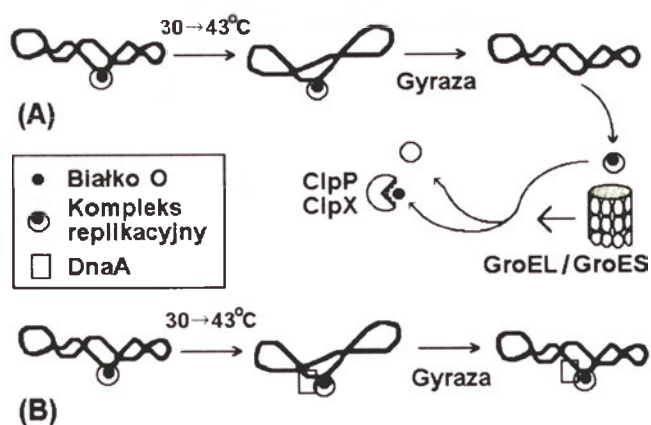
VII. Mechanizm rozpadu kompleksu replikacyjnego λ

Jak zaznaczono wyżej, replikacja plazmidów λ przy braku syntezy białka O odbywa się dzięki funkcjonowaniu dziedzicznego kompleksu replikacyjnego zawierającego białko O chronione przed proteolizą przez inne elementy tego kompleksu. Mimo że obecnie nie jest znana dokładna budowa dziedzicznego kompleksu replikacyjnego, badania genetyczne wskazują, że w jego skład obok fagowych białek O i P wchodzi jeszcze co najmniej helikaza DnaB [28, 47].

Dziedziczny kompleks replikacyjny jest strukturą bardzo stabilną, mogącą funkcjonować co najmniej przez kilkadziesiąt generacji komórkowych [34]. Jednakże okazało się, że w specyficznych warunkach, na przykład po przeniesieniu hodowli bakteryjnej z 30 do

43°C, kompleks ten może ulegać rozpadowi a uwolnione białko O staje się substratem dla proteazy ClpXP [48]. Okazało się, że w procesie rozpadu kompleksu replikacyjnego λ po szoku termicznym konieczna jest funkcja białek GroEL i GroES [48]. Jednakże sama nadprodukcja tych białek nie jest wystarczająca, gdyż konieczne jest także szybkie podwyższenie temperatury. Wykazanie, że rozpad kompleksu replikacyjnego λ nie zachodzi po zahamowaniu aktywności gryzazy DNA [49] doprowadziło z kolei do stwierdzenia, że w wyniku szoku termicznego dochodzi do częściowej i przejściowej relaksacji DNA λ [49]. Proces powrotu do wyjściowego stanu superskręcenia DNA odbywający się dzięki aktywności gryzazy DNA jest natomiast przyczyną dysocjacji kompleksu replikacyjnego od DNA [49]. Białka GroEL i GroES powodują następnie rozbitcie kompleksu i uwolnienie białka O, które jest degradowane przez proteazę ClpXP [49]. Proces ten jest przedstawiony schematycznie na rycinie 6.

Niespodziewanie zaobserwowano, że do rozpadu kompleksu replikacyjnego po szoku termicznym nie dochodzi w przypadku plazmidów λ *cro*⁻ w dzikiego typu bakterii [34, 49]. Niemniej jednak nawet brak białka Cro nie zapobiegał rozpadowi kompleksu replikacyjnego λ w mutantach *dnaA* [50]. Również usunięcie niektórych sekwencji wiążących białko DnaA z plazmidu λ *cro*⁻ powodowało destabilizację kompleksu replikacyjnego w dzikiego typu bakterii [50]. Na podstawie tych wyników zaproponowano, że białko DnaA uczestniczy w stabilizacji kompleksu replikacyjnego λ , a jego działanie jest bardziej efektywne w przypadku braku białka Cro. Białko DnaA może wiązać się z DNA λ oraz oddziaływać z pozostałymi



Ryc. 6. Schemat rozpadu kompleksu replikacyjnego λ po szoku termicznym (A) oraz mechanizm stabilizacji tego kompleksu przez białko DnaA w przypadku mutantu *cro* (B). Szok termiczny powoduje częściową i przejściową relaksację DNA, a katalizowany przez gyrazę DNA powrót do wyjściowego stanu superskręcenia DNA powoduje dysocjację kompleksu replikacyjnego λ a następnie jego rozkład w wyniku działania białek GroEL i GroES. Uwolnione z kompleksu białko O jest degradowane przez proteazę ClpXP. W przypadku braku funkcji białka Cro, białko DnaA może efektywnie oddziaływać jednocześnie z DNA λ jak i z elementami kompleksu replikacyjnego zwiększając tym samym stabilność tej struktury.

składnikami kompleksu replikacyjnego zwiększając jego stabilność. Białko Cro także wiąże się do DNA λ , zatem możliwa jest konkurencja obu tych białek (DnaA i Cro) o wiązanie się do DNA λ w rejonie replikacyjnym. Stąd przy braku Cro, białko DnaA może efektywniej stabilizować kompleks replikacyjny λ (Ryc. 6).

VIII. Replikacja plazmidów λ w cyklu komórkowym *Escherichia coli*

Doświadczenia nad replikacją naturalnych plazmidów pochodzących od bakteriofaga λ przeprowadzone przed wielu laty sugerowały, że dzikiego typu plazmidy replikują się niezależnie od cyklu komórkowego *E. coli* [51]. Niedawne badania przeprowadzone nad plazmidami λ skonstruowanymi *in vitro* potwierdziły te obserwacje, dostarczyły jednakże nowych ciekawych danych, mianowicie że plazmidy z mutacją w genie *cro* replikują się zależnie od cyklu komórkowego i każda cząsteczka replikuje się raz podczas jednej generacji komórkowej [52]. Być może białko DnaA (które wydaje się odgrywać kluczową rolę w regulacji replikacji chromosomu bakteryjnego w cyklu komórkowym) jest odpowiedzialne za kontrolę inicjacji replikacji plazmidu λ w określonej fazie cyklu komórkowego [52].

IX. Uwagi końcowe

Badania ostatnich lat potwierdziły raz jeszcze, że bakteriofag λ może być nadal znakomitym modelem badawczym w biologii molekularnej. Prace nad mechanizmami regulacji replikacji DNA λ przyniosły wyniki o ogólnym znaczeniu. Wydaje się prawdopodobne, że wykryte po raz pierwszy u plazmidów λ zjawisko dziedziczenia kompleksu replikacyjnego, może występować w zmodyfikowanej formie także w komórkach eukariotycznych [53-57]. Zaproponowany mechanizm przejścia replikacji typu θ w replikację typu σ podczas rozwoju faga λ może stanowić punkt wyjścia do badań nad analogicznymi mechanizmami replikacji materiału genetycznego innych wirusów, u których replikacja DNA zachodzi w podobny sposób (np. wirusa *Herpes simplex*) [58]. Zjawisko rozpadu kompleksu replikacyjnego λ po szoku termicznym było pierwszym przykładem udziału białek GroEL i GroES w rozkładzie złożonych struktur biologicznych. Podobna aktywność białka GroEL została potwierdzona ostatnio w innych układach doświadczalnych [59]. Wykazanie zależnej od cyklu komórkowego gospodarza replikacji plazmidów λ niosących mutację w genie *cro* daje szansę użycia tych plazmidów w dalszych badaniach jako najprostszyc znanych replikonów, których replikacja jest specyficznie inicjowana w określonej fazie cyklu komórkowego [52].

Podziękowanie

Badania nad replikacją DNA faga i plazmidów λ finansowane były przez KBN i Uniwersytet Gdański.

Artykuł otrzymano 22 października 1998 r.
Zaakceptowano do druku 3 grudnia 1998 r.

Piśmiennictwo

1. Thomas R (1993) *BioEssays* **15**: 285-289
2. Taylor K, Węgrzyn G (1998) W: Busby SJW, Thomas CM, Brown NL (red) *Molecular Microbiology* Springer Verlag, Berlin/Heidelberg, str. 81-97
3. Marszałek J (1994) *Post Biochem* **40**: 200-210
4. Marszałek J (1997) *Post Biochem* **43**: 5-12
5. Węgrzyn G (1997) *Post Biol Kom* **24** (supl. 8): 37-51
6. Taylor K, Węgrzyn G (1995) *FEMS Microbiol Rev* **17**: 109-119
7. Wold MS, Mallory JB, Roberts JD, Le Bowitz JH, McMacken R (1982) *Proc Natl Acad Sci USA* **79**: 6176-6180
8. Żylicz M, Górska I, Taylor K, Georgopoulos C (1984) *Mol Gen Genet* **196**: 401-406
9. Alfano C, McMacken R (1989) *J Biol Chem* **264**: 10699-10708
10. Wickner S, Hurwitz J (1975) *Proc Natl Acad Sci USA* **72**: 921-925
11. Wickner SH (1979) *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol* **43**: 303-310
12. Biswas SB, Biswas EE (1987) *J Biol Chem* **262**: 7831-7838
13. Mallory JB, Alfano C, McMacken R (1990) *J Biol Chem* **265**: 13297-13307
14. Dodson M, Echols H, Wickner S, Alfano C, Mensa-Wilmot K, Gomes B, LeBowitz J, Roberts JD, McMacken R (1986) *Proc Natl Acad Sci USA* **83**: 7638-7642
15. Żylicz M, Ang D, Liberek K, Yamamoto T, Georgopoulos C (1988) *Biochim Biophys Acta* **951**: 344-350
16. Żylicz M, Ang D, Liberek K, Georgopoulos C (1989) *EMBO J* **8**: 1601-1608
17. Liberek K, Georgopoulos C, Żylicz M (1988) *Proc Natl Acad Sci USA* **85**: 6632-6636
18. Alfano C, McMacken R (1989) *J Biol Chem* **264**: 10709-10718
19. Mensa-Wilmot K, Seaby R, Alfano C, Wold MS, Gomes B, McMacken R (1989) *J Biol Chem* **264**: 2853-2861
20. Matsubara K (1981) *Plasmid* **5**: 32-52
21. Lipińska B, Podhajska A, Taylor K (1980) *Biochem Biophys Res Commun* **92**: 120-126
22. Gottesman S, Gottesman M, Shaw JE, Pearson ML (1981) *Cell* **24**: 225-233
23. Dove WF, Hargrove E, Ohashi M, Haugli F, Guha A (1969) *Jpn J Genet* **44** (supl. 1): 11-22
24. Węgrzyn G, Kwaśnik E, Taylor K (1991) *Acta Biochim Pol* **38**: 181-186
25. Węgrzyn G, Neubauer P, Krueger S, Hecker M, Taylor K (1991) *Mol Gen Genet* **225**: 94-98
26. Węgrzyn G, Taylor K (1992) *J Mol Biol* **226**: 681-688
27. Węgrzyn G, Pawłowicz A, Taylor K (1992) *J Mol Biol* **226**: 675-680
28. Węgrzyn A, Węgrzyn G, Taylor K (1995) *Virology* **207**: 179-184
29. Węgrzyn A, Węgrzyn G, Taylor K (1995) *Mol Gen Genet* **245**: 501-508
30. Szalewska-Pałasz A, Węgrzyn A, Herman A, Węgrzyn G (1994) *EMBO J* **13**: 5779-5785
31. Szalewska-Pałasz A, Węgrzyn G (1995) *Acta Biochim Pol* **42**: 233-240
32. Wróbel B, Murphy H, Cashel M, Węgrzyn G (1998) *Mol Gen Genet* **257**: 490-495
33. Szalewska A, Węgrzyn G, Taylor K (1994) *Mol Microbiol* **13**: 469-474
34. Węgrzyn A, Węgrzyn G, Herman A, Taylor K (1996) *Genes Cells* **1**: 953-963
35. Węgrzyn A, Węgrzyn B (1998) *Biochem Biophys Res Commun* **246**: 634-639
36. Węgrzyn A, Taylor K, Węgrzyn G (1996) *J Bacteriol* **178**: 5847-5849
37. Węgrzyn A, Węgrzyn G (1995) *Biochem Biophys Res Commun* **214**: 978-984
38. Szalewska-Pałasz A, Węgrzyn G (1994) *Biochem Biophys Res Commun* **205**: 802-806
39. Herman-Antosiewicz A, Śrutkowska S, Taylor K, Węgrzyn G (1998) *Plasmid* **40**: 113-125
40. Węgrzyn G, Szalewska-Pałasz A, Węgrzyn A, Obuchowski M, Taylor K (1995) *Gene* **154**: 47-50
41. Kur J, Górska I, Taylor K (1987) *J Mol Biol* **198**: 203-210
42. Węgrzyn G, Węgrzyn A, Pankiewicz A, Taylor K (1996) *Mol Gen Genet* **252**: 580-586
43. Szalewska-Pałasz A, Węgrzyn A, Błaszczak A, Taylor K, Węgrzyn G (1998) *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 4241-4246
44. Learn B, Karzai AW, McMacken R (1993) *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol* **58**: 389-402
45. Węgrzyn G, Węgrzyn A, Konieczny I, Bielawski K, Konopa G, Obuchowski M, Helinski DR, Taylor K (1995) *Genetics* **139**: 1469-1481
46. Szalewska-Pałasz A, Weigel C, Speck C, Śrutkowska S, Konopa G, Lurz R, Marszałek J, Taylor K, Messer W, Węgrzyn G (1998) *Mol Gen Genet* **259**: 679-688
47. Pawłowicz A, Węgrzyn G, Taylor K (1993) *Acta Biochim Pol* **40**: 29-31
48. Węgrzyn A, Węgrzyn G, Taylor K (1996) *Virology* **217**: 594-597
49. Węgrzyn A, Herman-Antosiewicz A, Taylor K, Węgrzyn G (1998) *J Bacteriol* **180**: 2475-2483
50. Herman-Antosiewicz A, Węgrzyn A, Taylor K, Węgrzyn G (1998) *Virology* **249**: 98-107
51. Matsubara K, Mukai T (1975) *J Biochem* **77**: 373-382
52. Herman-Antosiewicz A, Węgrzyn G (1998) *Biochem Biophys Res Commun* **247**: 554-557
53. Bell SP, Stillman B (1992) *Nature (Lond)* **357**: 128-134
54. Diffley JFX, Cocker JH (1992) *Nature (Lond)* **357**: 169-172
55. Stillman B (1994) *J Biol Chem* **269**: 7047-7050
56. Botchan M (1996) *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 9997-10000
57. Donovan S, Diffley JFX (1996) *Curr Opin Genet Dev* **6**: 203-207
58. Kornberg A, Baker T (1992) *DNA Replication*, W.H. Freeman and Company, New York
59. Chatellier J, Hill F, Lund P, Fersht AR (1998) *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 9861-9866



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

Regulacja ekspresji genów miozyny mięśniowych ssaków

Regulation of mammalian muscle myosin genes expression

KRZYSZTOF NIEZNAŃSKI*

Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Tkankowo-specyficzna ekspresja genów miozyny
- III. Ekspresja genów miozyny specyficzna dla etapu rozwoju mięśnia
- IV. Zmiany poziomu ekspresji genów miozyny w dojrzałym mięśniu
- V. Elementy sekwencyjne i czynniki transkrypcyjne odpowiedzialne za regulację ekspresji genów miozyny
- VI. Uwagi końcowe

Wykaz stosowanych skrótów: MHC — *myosin heavy chain*, łańcuch ciężki miozyny; MLC — *myosin light chain*, łańcuch lekki miozyny; Sp — *Semimembranosus proprius*, mięsień półbłoniasty własny; Sa — *Semimembranosus accessorius*, mięsień półbłoniasty dodatkowy; SRF — *serum response factor*, czynnik odpowiedzi na surowicę; TEF-1 — *transcription enhancer factor-1*, czynnik 1 wzmacniacza transkrypcji; bHLH domain — *basic-helix-loop-helix domain*, zasadowa domena helisa-pętla-helisa; MEF-2 — *myocyte enhancer binding factor-2*, czynnik 2 wiążący specyficzny dla miocytów wzmacniacz transkrypcji; CSS — *cardiac specific sequence*, sekwencja sercowo-specyficzna

I. Wstęp

Miozyna klasy II, tzw. miozyna konwencjonalna, jest białkiem motorycznym wchodzącym w skład aparatu kurczliwego mięśni wszystkich typów [1]. Jej cząsteczka jest heksamerem złożonym z dwóch łańcuchów ciężkich, z których każdy wiąże się z jednym istotnym i jednym regulującym łańcuchem lekkim [2]. Opisano wiele izoform łańcuchów ciężkich (MHC) i lekkich miozyny (MLC). W większości, izoformy te są produktami różnych genów [3-6]. Jedynie niektóre izoformy powstają na drodze alternatywnego wycinania intronów (ang. *alternative splicing*) [7, 8]. Wykazano, że w mięśniach różnych typów występują na ogół różne izoformy łańcuchów ciężkich i lekkich miozyny. Jest to konsekwencją tkankowo-specyficznej regulacji ekspresji genów kodujących te izoformy. Specyficzne zmiany we wzorze ekspresji izoform łańcuchów ciężkich i lekkich miozyny zachodzą podczas rozwoju mięśnia, a także w dojrzałym mięśniu [9-14]. Zmiany te wpływają na właściwości kurczliwe mięśnia. Po-

Contents:

- I. Introduction
- II. Tissue-specific expression of myosin genes
- III. Myosin genes expression specific for the stage of muscle development
- IV. Changes in the level of myosin genes expression in adult muscle
- V. Sequence elements and transcription factors responsible for regulation of myosin genes expression
- VI. Concluding remarks

znanie mechanizmów regulujących ekspresję genów miozyny przyczyni się do zrozumienia molekularnych podstaw zjawiska adaptacji aparatu kurczliwego mięśni do wymagań funkcjonalnych. Specyficzna ekspresja izoform miozyny w komórkach mięśniowych może stanowić ponadto doskonały układ doświadczalny do badania mechanizmów regulacji ekspresji genów. Stąd też zagadnienie to cieszy się dużym zainteresowaniem.

II. Tkankowo-specyficzna ekspresja genów miozyny

Jak dotąd opisano kilkanaście izoform łańcuchów lekkich i kilkanaście izoform łańcuchów ciężkich miozyny (Tab. 1). Te różne izoformy są specyficznie ekspresjonowane w komórkach mięśnia szkieletowego, sercowego lub gładkiego. Tylko nieliczne izoformy są wspólne dla mięśni różnych typów.

W komórkach mięśnia sercowego ssaków ulegają ekspresji dwa geny kodujące MHC: α -MHC i β -MHC, ułożone w tandemie na chromosomie 14 [15-17]. Izofорма β występuje w mięśniu komór sercowych, zaś występowanie izoformy α ograniczone jest do mięśnia przedsionków. Jedynie u drobnych ssaków, α -MHC jest ekspresjonowany zarówno w mięśniu komór jak i przedsionków, natomiast β -MHC nie ulega ekspresji w sercu dorosłego organizmu [22]. Izofорма β -MHC występuje także w mięśniach szkieletowych wolno kurczących się (tzw. wolnych) [27]. W sercu wykryto 5 różnych izoform MLC: 3 regulatorowe, w tym VLC-2 i VLC-2* specyficzne dla komór i ALC-2 specyficzną dla przedsionków oraz dwie izoformy istotnego łańcucha lekkiego: VLC-1 występującą w komórkach i ALC-1 występującą w przedsionkach [18-20]. ALC-1 ulega ponadto ekspresji w całym mięśniu

*Dr. Zakład Biochemii Mięśni, Instytut Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego PAN, ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa

Tabela 1.

Izoformy łańcuchów lekkich i ciężkich miozyny oraz miejsce ich występowania (na podstawie [11, 15-27, 29, 32-34, 36-41, 43-46]).

| Typ mięśnia | Izoformy łańcuchów ciężkich | Izoformy łańcuchów lekkich | | |
|-------------|--|---|--|------------------------|
| | | istotnych | regulujących | |
| sercowy | komora | β -MHC = MHC-I | VLC-1 = MLC-1S | VLC-2 = MLC-2S, VLC-2* |
| | przedsionek | α -MHC | ALC-1 = MLC-1 emb | ALC-2 |
| szkieletowy | wolny | MHC-I, MHCemb, MHCpn | MLC-1S, MLC-1S', MLC-1 emb | MLC-2S |
| | szybki | MHC-IIa, IIb, IIx/d, MHCemb, MHCpn | MLC-1F, MLC-3F, MLC-1 emb | MLC-2F |
| gładki | SMMHC-1A, -1B SMMHC-2A, -2B SMMHCemb(NMMHC-B) NMMHC-A | LC _{17a} (LC _{17nm}) LC _{17b} (LC _{17g}) | LC ₂₀ LC _{20nm} | |

sercowym i mięśniach szkieletowych zarodków ssaków, stąd izoformę tę nazywa się często embrionalnym MLC (MLC-1 emb) [18]. Izoformy komorowe: VLC-1 i VLC-2 są ekspresjonowane także w mięśniach szkieletowych wolnych dorosłego organizmu [21, 22].

Wykazano, że różne typy włókien mięśni szkieletowych charakteryzują się różnym wzorem ekspresji izoform miozyny [3, 23]. W wolno kurczących się włóknach mięśniowych typu I oraz szybko kurczących się włóknach typu II (tzw. szybkich) występują różne izoformy MHC, które wykazują różną aktywność ATPazową i są odpowiedzialne za różną szybkość kurczenia się. W mięśniach szkieletowych dorosłych ssaków można wyróżnić 3 subpopulacje włókien typu II: IIA, IIB i IIX/D, w których ulegają ekspresji odpowiednie izoformy łańcuchów ciężkich: MHC-IIa, -IIb i -IIX/d [24-26]. We włóknach typu I ekspresjonowana jest izoforma MHC-I identyczna z komorową izoformą β -MHC [27]. Najnowsze badania wskazują na istnienie nawet trzech izoform łańcucha ciężkiego we włóknach wolnych [28]. Ponadto w rozwijającym się mięśniu szkieletowym zarodka wykrywa się dwie izoformy MHC zwane embrionalną i okołourodzeniową [11, 29]. Ostatnio wykazano, że izoforma sercowa α -MHC występuje także w mięśniu pozaoocnym i żwaczu — dwóch wyspecjalizowanych mięśniach szkieletowych [30, 31]. W mięśniach szkieletowych ssaków ulegają ekspresji 4 różne izoformy istotnych łańcuchów lekkich: MLC-1S i MLC-1S' we włóknach typu I oraz MLC-1F i MLC-3F we włóknach typu II, a także dwie izoformy regulujących łańcuchów lekkich: MLC-2S we włóknach typu I i MLC-2F we włóknach typu II [21, 32-34]. Izoforma MLC-1S jest identyczna z komorową izoformą VLC-1, a MLC-2S z komorową izoformą VLC-2 [21, 33]. Jedynie MLC-1F i -3F są produktami jednego genu, powstającymi w wyniku alternatywnego wycinania intronów [8, 32, 35].

W komórkach mięśni gładkich występują 4 izoformy łańcuchów ciężkich: SMMHC-1A, -2A, -1B, -2B,

które są produktami jednego genu [7, 36-38]. Ponadto, podczas wczesnych etapów rozwoju mięśnia gładkiego wykrywane są dwie izoformy: NMMHC-A i NMMHC-B (SMMHCemb), kodowane przez dwa różne geny [39-41]. Izoformy SMMHC są ekspresjonowane specyficznym w komórkach mięśni gładkich, natomiast NMMHC-A i -B ulegają ekspresji także w komórkach niemięśniowych [42]. W komórkach mięśni gładkich wykryto dwie izoformy istotnych łańcuchów lekkich: LC_{17b} (LC_{17g}) specyficzną dla mięśni gładkich oraz LC_{17a} (LC_{17nm}) występującą także w komórkach niemięśniowych [43-45]. Izoforma LC_{17b} przeważa w mięśniach trzewnych, zaś LC_{17a} w mięśniach gładkich naczyń krwionośnych. Obie izoformy istotnych MLC są produktami jednego genu, powstającymi na drodze alternatywnego wycinania intronów [45]. W miocytach mięśni gładkich ulegają ekspresji także dwie izoformy regulujących MLC: LC₂₀, specyficzna dla tych mięśni oraz LC_{20nm}, występująca także w komórkach niemięśniowych [46].

III. Ekspresja genów miozyny specyficzna dla etapu rozwoju mięśnia

Ekspresja genów kodujących izoformy łańcuchów ciężkich i łańcuchów lekkich miozyny jest specyficzna także dla etapu rozwoju mięśnia. Kolejność pojawiania się poszczególnych izoform jest ściśle skorelowana z określonymi etapami rozwoju mięśni zarodka i noworodka.

Jak dotąd najbardziej szczegółowo opisano kolejność pojawiania się izoform miozyny podczas rozwoju mięśni szkieletowych ssaków (Tab. 2). Pierwszym łańcuchem ciężkim wykrywanym w rozwijającym się mięśniu szkieletowym zarodka jest MHCemb [11]. Pojawia się on w miotomie, czyli pierwszym mięśniu szkieletowym formującym się w zarodku, w około 9-10 dni po zapłodnieniu (u myszy) i staje się izoformą dominującą. W tym okresie wykrywana jest też izoforma komorowa β -MHC/MHC-I [11, 27]. Izoforma ta

Tabela 2.

Kolejność pojawiania się izoform miozyny podczas rozwoju mięśni szkieletowych zarodka myszy (wg [11]). Gwiazdką zaznaczono pierwsze pojawienie się białka w rozwijającym się mięśniu. Znakami równości lub większości przedstawiono relatywny poziom ekspresji poszczególnych izoform. Skrót d p.c. oznacza dni po zapłodnieniu.

| 9-10 d p.c. | 10,5 d p.c. | 12,5 d p.c. | 15,5 d p.c. |
|---|--|--|--|
| MHCemb*, β-MHC*, ALC-1*, MLC-1F* | MHCpn* MHCemb > MHCpn = β-MHC ALC-1 > MLC-1F | MHCpn = MHCemb > β-MHC ALC-1 = MLC-1F | MHCpn > MHCemb > β-MHC MLC-1F > ALC-1 |

jest ekspresjonowana podczas całego okresu rozwoju embrionalnego, lecz na znacznie niższym poziomie niż MHCemb. W około 9-10 dni po zapłodnieniu w miotomie myszy pojawiają się też dwie izoformy istotnych łańcuchów lekkich, a mianowicie przedsionkowa izoforma ALC-1 i izoforma MLC-1F, charakterystyczna dla mięśni szkieletowych szybkich [47, 11]. W tym przypadku izoforma sercowa jest izoformą dominującą. Dominacja izoformy ALC-1 nad MLC-1F utrzymuje się w mięśniach szkieletowych zarodka myszy do około 12 dnia po zapłodnieniu, kiedy to poziom ekspresji obu izoform ulega wyrównaniu. Dopiero w 15-dniowym zarodku izoforma MLC-1F zaczyna przeważać nad izoformą przedsionkową. Kolejna izoforma łańcucha ciężkiego tzw. okołourodzeniowa (MHCpn), pojawia się po około 10 dniach od zapłodnienia i stopniowo zaczyna zastępować izoformę embrionalną [11]. W 12-dniowym zarodku myszy ekspresja obu izoform łańcucha ciężkiego jest wyrównana, a po 15 dniu rozwoju embrionalnego izoforma okołourodzeniowa zaczyna przeważać nad izoformą embrionalną. Mimo że MLC-1F i MLC-3F są produktami tego samego genu, izoforma MLC-3F wykrywana jest dopiero po 15 dniu od zapłodnienia [11, 48]. Wtedy też po raz pierwszy pojawia się izoforma komorowa łańcucha istotnego VLC-1, tożsama z izoformą MLC-1S [11]. Po urodzeniu izoformy łańcuchów ciężkich MHCemb i MHCpn przestają być wykrywane [10]. Przypuszcza się, że ekspresja obu izoform może podlegać wspólnemu mechanizmowi negatywnej regulacji. Wyjątek stanowią specyficzne mięśnie pozaoczny i żwacz, w których MHCpn oraz MHCemb (tylko w mięśniu pozaocznym) ulegają ekspresji także w dorosłym organizmie ssaka [51, 52]. Także ekspresja ALC-1 zanika po urodzeniu w mięśniach szkieletowych, a zostaje utrzymana w mięśniu przedsionków serca [48, 53]. Izoformy MHC typu II nie są wykrywane przed urodzeniem [9, 11]. Komórki mięśni szkieletowych zarodka wykazują taki sam wzór ekspresji genów miozynowych, niezależnie od tego czy są prekursorami włókien szybkich czy wolnych [49]. Determinacja typu włókna następuje dopiero po urodzeniu [49, 54, 55]. Uważa się, że zasadniczą rolę w tej determinacji odgrywa, rozwijający się w pełni po urodzeniu, typ unerwienia motorycznego charakterystycznego dla typu włókna [49]. Na różnicowanie włókien ma wpływ także hormon tarczycy — trój-

jodotyronina, który hamuje ekspresję izoformy wolnej MHC-I/β-MHC [27, 50]. Różnicowanie się włókien mięśni szkieletowych związane jest z zahamowaniem ekspresji izoformy MHC-I/β-MHC i rozpoczęciem ekspresji izoform typu II w formującym się włóknie szybkim oraz zwiększeniem ekspresji MHC-I/β-MHC w formującym się włóknie wolnym [49, 54]. Na uwagę zasługuje fakt, że ekspresja izoform miozyny ma charakter sekwencyjny — podczas rozwoju izoformy embrionalne zastępowane są przez okołourodzeniowe, a te z kolei przez izoformy charakterystyczne dla dorosłego organizmu.

Nieco inny wzór ekspresji izoform miozyny obserwowany jest podczas rozwoju embrionalnego mięśnia sercowego niż mięśnia szkieletowego. Miozyna jest wykrywana w sercu zarodka myszy wcześniej niż w mięśniu szkieletowym zarodka, bo już około 8 dnia po zapłodnieniu [11, 56, 57]. W odróżnieniu od embrionalnego mięśnia szkieletowego, w mięśniu sercowym nie występuje MHCemb i MHCpn [11]. W sercu zarodka izoformy ALC-1 i VLC-1 są koekspresjonowane, przy czym izoforma ALC-1 przeważa w mięśniu przedsionków, zaś VLC-1 w mięśniu komór [11, 57]. Zahamowanie ekspresji izoformy ALC-1 w komorach i izoformy VLC-1 w przedsionkach obserwowane jest dopiero po urodzeniu [57]. Wzór ekspresji izoform regulujących MLC już na wczesnych etapach rozwoju mięśnia sercowego przypomina wzór charakterystyczny dla dorosłego organizmu ssaka. Izoforma VLC-2 pojawia się w mięśniu komór serca zarodka już 8 dnia po zapłodnieniu i od samego początku jej ekspresja jest ograniczona wyłącznie do tej części mięśnia sercowego [56]. Izoforma ALC-2 wykrywana jest głównie w mięśniu przedsionków serca zarodka [58]. Podobnie jak w przypadku mięśni szkieletowych, charakterystyczny dla dorosłego organizmu wzór ekspresji izoform sercowych MHC, obserwowany jest dopiero po urodzeniu. Podczas rozwoju embrionalnego w mięśniu przedsionków i komór zachodzi koekspresja izoformy β-MHC i α-MHC [57]. W 9,5 dnia po zapłodnieniu ekspresja β-MHC zaczyna być ograniczana do komór, natomiast α-MHC jest nadal ekspresjonowany w całym mięśniu sercowym zarodka, przy czym na wyższym poziomie w przedsionkach.

W rozwijającym się mięśniu gładkim ulegają ekspresji dwie niemięśniowe izoformy łańcucha ciężkiego: NMMHC-A i NMMHC-B SMMHCemb [39-41].

SMMHCemb jest dominującą izoformą w mięśni gładkim zarodka i noworodka, a następnie jego ekspresja, w dojrzałym mięśni, ulega zahamowaniu. Jedynie w mięśniach gładkich naczyń dorosłego ssaka obserwowany jest niski poziom ekspresji izoform niemięśniowych. Izofomy SMMHC-1A i -1B pojawiają się wcześniej niż SMMHC-2A i -2B i są wykrywane podczas rozwoju embrionalnego i okołourodzeniowego [59, 60]. SMMHC-2A i -2B pojawiają się dopiero po urodzeniu, a w około 20 dni po urodzeniu poziom ekspresji izoform SMMHC-1 i -2 ulega wyrównaniu [61, 62]. Jedynie te cztery izofomy występują w dojrzałych mięśniach gładkich. Zależnie od rodzaju mięśnia proporcja izoform SMMHC względem siebie może ulegać zmianie [63]. Regulacja ekspresji tych izoform odbywa się na poziomie alternatywnego wycinania intronów [7].

IV. Zmiany poziomu ekspresji genów miozyny w mięśni dorosłego organizmu

Zmiany poziomu ekspresji genów izoform miozyny obserwuje się nie tylko podczas rozwoju mięśni, ale także w dojrzałych mięśniach. Znane od dawna zjawisko plastyczności mięśni związane jest ze zdolnością komórek mięśniowych do modulowania poziomu ekspresji białek aparatu kurczliwego w odpowiedzi na bodźce środowiskowe. Zdolność ta pozwala dojrzałym mięśniom na adaptację do funkcjonalnych wymagań.

Już w 1960 roku Buller wykazał, że właściwości mięśni szkieletowych są ściśle zależne od ich unerwienia motorycznego [12]. Właściwości mięśnia szkieletowego są zmieniane w wyniku odnerwienia (odłączenia nerwu motorycznego), unerwienia krzyżowego lub elektrycznej stymulacji impulsami o częstotliwości charakterystycznej dla stymulacji mięśnia innego typu [64-67]. Jak później wykazano, zabiegi te prowadzą do zmian w poziomie ekspresji izoform

miozyny i wskazują na istotną rolę unerwienia motorycznego, a tym samym specyficznego wzoru aktywności motorycznej, w regulacji ekspresji miozyny [68-71]. Przedstawione w tabeli 3 wyniki doświadczeń Baccou i wsp. [72] najlepiej obrazują wpływ unerwienia motorycznego na ekspresję izoform miozyny w komórkach mięśni szkieletowych. Doświadczenia te polegały na oznaczeniu poziomu ekspresji różnych izoform MHC po odnerwieniu i krzyżowym unerwieniu mięśnia wolnego *Semimembranosus proprius* (Sp) nerwem mięśnia szybkiego *Semimembranosus accessorius* (Sa) oraz po odnerwieniu i elektrycznej stymulacji Sa impulsami o częstotliwości 10 Hz — częstotliwości charakterystycznej dla stymulacji mięśnia wolnego. Sp jest mięśniem wolnym, w którym ulega ekspresji wyłącznie izoforma MHC-I oraz tzw. wolne izofomy MLC. Samo odnerwienie Sp nie wywołuje zmian w ekspresji MHC, a jedynie indukuje ekspresję embrionalnego MLC. Dopiero 5-miesięczne krzyżowe unerwienie Sp indukuje *de novo* ekspresję izoform szybkich MHC IIa, IIx/IIc oraz IIb i znacznie obniża ekspresję izoformy wolnej MHC-I. Zmiana w typie unerwienia mięśnia wolnego nie powoduje jednak całkowitej transformacji w mięsień szybki. Natomiast dwumiesięczna stymulacja impulsami o niskiej częstotliwości mięśnia Sa, w którym wykrywane są wyłącznie izofomy MHC typu II, wystarcza dla nieomal całkowitej transformacji tego mięśnia w mięsień typu wolnego, w którym występuje głównie MHC-I. Powyższe wyniki badań pozwoliły na określenie stopnia wrażliwości ekspresji różnych izoform MHC na unerwienie motoryczne. Wrażliwość ta zmienia się zgodnie ze schematem: MHC-IIb > IIx/IIc > IIa > I. Zatem najbardziej wrażliwa na specyficzne unerwienie jest ekspresja izoformy MHC-IIb — charakteryzującej się najwyższą aktywnością ATPazową, a najmniej wrażliwa ekspresja izoformy MHC-I — o najniższej aktywności ATPazowej. Ekspresja izoform MLC wykazuje mniejszą zależność od unerwienia niż ekspresja izoform MHC, niemniej w odnerwionym mięśniu szybkim stymulowanym impulsami o częstotliwości charakterystycznej dla stymulacji mięśnia wolnego, obserwuje się re-ekspresję MLC-1S i obniżenie ekspresji MLC-1F, MLC-2F, MLC-3F [14, 73]. W tym przypadku najbardziej wrażliwa jest ekspresja izoformy MLC-2F.

Zmiany w poziomie ekspresji miozyny zachodzą także w warunkach przeciążenia mechanicznego mięśnia [74-76]. Podczas wywołanej przeciążeniem mechanicznym hipertrofii mięśnia szkieletowego obserwuje się stymulację ekspresji izoformy MHC-I. Przy hipertrofii pojawiają się też niewielkie ilości MHCemb i MHCpn [76]. Nie wykrywa się natomiast istotnych zmian w ekspresji izoform MLC.

Od dawna wiadomo, że hormony tarczycy są istotne dla prawidłowego rozwoju mięśni szkieletowych kręgowców [77, 78]. Wykazano, że ekspresja wszystkich członków wielogenowej rodziny łańcuchów ciężkich

Tabela 3

Zmiany we wzorze ekspresji izoform MHC w mięśni *Semimembranosus proprius* unerwionym krzyżowo nerwem motorycznym mięśnia szybkiego *Semimembranosus accessorius* (część A) oraz w odnerwionym mięśni *Semimembranosus accessorius* poddanym stymulacji impulsami o częstotliwości 10 Hz (część B) [wg 72].

| | Czas trwania doświadczenia (miesiące) | Procentowy udział izoform MHC | | | | |
|---|---------------------------------------|-------------------------------|-----|---------|-----|----|
| | | I | IIa | IIx/IIc | IIb | pn |
| A | Kontrola | 100 | — | — | — | — |
| | 1 | 90 | 6 | — | — | 4 |
| | 2 | 83 | 9 | 8 | — | — |
| | 3 | 76 | 11 | 13 | — | — |
| | 5 | 37 | 42 | 19 | 2 | — |
| B | Kontrola | — | 9 | 20 | 71 | — |
| | 1 | 24 | 28 | 47 | — | 1 |
| | 1,5 | 57 | 18 | 25 | — | — |
| | 2 | 96 | 2 | 2 | — | — |
| | 3 | 96 | 2 | 2 | — | — |

miozyny jest wrażliwa na trójiodotyroninę [50, 79, 80]. Traktowanie wolnego mięśnia *soleus*, w którym ekspresjonowana jest w około 90% izoforma MHC-I, 8% MHC-IIa oraz w śladowych ilościach MHC-IIb i -IIx/d, trójiodotyroniną prowadzi do znacznego obniżenia ekspresji MHC-I oraz stymulacji ekspresji izoform szybkich MHC-IIa i -IIx/d [80]. Trójiodotyronina stymuluje również ekspresję izoform MLC-1F, -2F, -3F we włóknach mięśnia *soleus*.

Także miocyty sercowe mogą adaptować się do warunków zwiększonego obciążenia mechanicznego, zmieniając poziom ekspresji izoform MHC i MLC [22]. Podczas hipertrofii mięśnia sercowego obserwuje się wyraźne zmiany w poziomie ekspresji genów α -MHC i β -MHC [81, 82]. W ciśnieniowo przeciążonym sercu dochodzi do nadekspresji β -MHC i obniżenia poziomu ekspresji izoformy α -MHC, co jest charakterystyczne dla odpowiedzi hipertroficznej. Zatem zarówno w hipertroficznym mięśniu szkieletowym, jak i hipertroficznym mięśniu sercowym, następuje zwiększenie ekspresji izoformy MHC-I/ β -MHC. Ponadto, podczas zwiększania obciążenia hemodynamicznego, ulega zmianom wzór ekspresji MLC [22]. Przędionkowa izoforma ALC-1, u dzieci z wrodzonymi chorobami serca, ulega ekspresji na wysokim poziomie w przerośniętym mięśniu prawej

komory [83]. Ekspresja *de novo* ALC-1 jest obserwowana także w przeciążonym mięśniu lewej komory pacjentów z chorobą zastawki serca [84, 85]. Interwencja chirurgiczna, normalizująca stan hemodynamiczny, prowadzi do obniżenia ekspresji ALC-1 w komorze sercowej.

Na poziom ekspresji sercowych izoform miozyny wpływają także hormony tarczycy [86]. Wykazano, że podobnie jak w mięśniach szkieletowych, hormony te silnie hamują ekspresję izoformy β -MHC w mięśniu sercowym [27, 87, 88].

Przeciążenie mechaniczne mięśni gładkich, podobnie jak mięśni prądkowanych, wywołuje zmiany we wzorze ekspresji izoform MHC. Zaobserwowano, że w mięśniach gładkich dochodzi do zwiększenia ekspresji SMMHC-2 na skutek stresu mechanicznego [89]. W stanach patologicznych ekspresja MHC ulega znacznym zmianom. W komórkach arteriosklerotycznych dochodzi do re-ekspresji SMMHCemb [39]. Komórki te charakteryzują się ponadto dominacją izoformy SMMHC-1, a zatem przypominają komórki mięśni gładkich zarodka [39].

Ekspresja MHC w dorosłych mięśniach gładkich, podobnie jak w innych typach mięśni, podlega regulacji hormonalnej. Ostatnio wykazano, że ekspresja izoform SMMHC w mięśniu gładkim macicy jest pod kontrolą estrogenu [90].

Tabela 4.

Elementy sekwencyjne i czynniki transkrypcyjne odpowiedzialne za regulację ekspresji genów miozyny (na podstawie [93, 96-101, 103, 107, 113, 114, 124-128, 131, 132, 134]). Znakiem \uparrow zaznaczono aktywację, zaś znakiem \downarrow hamowanie transkrypcji.

| Gen | Element sekwencyjny | Czynnik transkrypcyjny |
|---------------|--|---|
| α -MHC | E-box - M-CAT \uparrow (EM) GATA \uparrow sekwencja wiążąca MEF-2 \uparrow CArG-box | Max (E-box), TEF-1 (M-CAT) białko GATA-4 MEF-2 SRF |
| β -MHC | E-box - M-CAT \uparrow GATA \uparrow | białko bHLH, TEF-1 białko GATA-4 |
| MHC-IIa | CArG-box E-box | SRF białko z rodziny MyoD |
| SMMHC | CArG-box \uparrow podobny do CArG-box \uparrow GC-box \downarrow E-box sekwencja wiążąca MEF-2 | SRF podobny do SRF Sp1 białko bHLH MEF-2 |
| ALC-1 | E-box \uparrow CArG-box GATA | białko bHLH SRF białko GATA |
| VLC-1 | CArG-box \uparrow GATA | SRF białko GATA |
| MLC-1F/-3F | CArG-box \uparrow sekwencja wiążąca MEF-2 \uparrow GATA \uparrow | SRF MEF-2 białko GATA |
| VLC-2 | CArG-box \uparrow E-box CSS \downarrow | SRF Max CSSBP1, CSSBP2 |

V. Elementy sekwencyjne i czynniki transkrypcyjne odpowiedzialne za regulację ekspresji genów miozyny

W ciągu ostatnich lat przeprowadzono wiele badań mających na celu wyjaśnienie mechanizmów regulacji specyficznej ekspresji genów miozyny. Wykazano, że ekspresja tych genów regulowana jest głównie na poziomie transkrypcji. Jak dotąd nie dla wszystkich genów miozyny znaleziono motywy sekwencyjne oraz czynniki transkrypcyjne odpowiedzialne za regulację ich ekspresji. Poznane motywy sekwencyjne oraz oddziałujące z nimi czynniki transkrypcyjne zebrano w tabeli 4.

Jednym z najczęściej występujących motywów sekwencyjnych w regionach promotorowych genów kodujących białka aparatu kurczliwego jest motyw CC(A/T)₆GG, zwany CARG-box [91-95]. CARG-box wykryto w regionie promotorowym genów: α -MHC, ALC-1, VLC-1, VLC-2, MHC-IIa, MLC-1F/-3F oraz SMMHC [93, 96-101]. Sekwencja CARG-box wiąże czynnik odpowiedzi na surowicę (SRF) [102]. Wykazano, że związanie SRF z CARG-box stymuluje tkankowo-specyficzną transkrypcję genu VLC-1, VLC-2, MLC-1F/-3F oraz SMMHC [93, 98-100]. W obrębie sekwencji promotorowej genu SMMHC wykryto aż trzy motywy CARG-box oraz podobną do CARG-box sekwencję regulującą pozytywnie ekspresję tego genu w komórkach mięśni gładkich [100]. Znaczenie motywu CARG-box w regulacji ekspresji genów α -MHC i ALC-1 nie jest w pełni jasne.

Sąsiadujące ze sobą motywy sekwencyjne E-box i M-CAT wykryto w regionach promotorowych genów kodujących izoformy sercowe białek aparatu kurczliwego: β -MHC, aktyny i troponiny T [103-106]. W obrębie sekwencji promotorowej genu kodującego przedsiionkową izoformę α -MHC oba te motywy zachodzą na siebie, stąd też nazwano je motywem hybrydowym EM (ang. *EM hybrid motif*) [107]. E-box charakteryzuje się konsensusową sekwencją CANNTG, zaś M-CAT sekwencją CATTCCT [106, 108]. Wykazano, że oba motywy są niezbędne dla pozytywnej regulacji ekspresji genu α -MHC. Przypuszcza się, że za pośrednictwem motywów E-box-M-CAT regulowana jest ekspresja genu α -MHC w odpowiedzi na aktywność kurczliwą kardiomiocytów. Z motywem EM wiążą się czynniki transkrypcyjne: białko Max z motywem E-box i TEF-1 (ang. *transcription enhancer factor-1*) z M-CAT [109]. Czynniki transkrypcyjne Max należy do nadrodziny zasadowych białek posiadających motyw strukturalny helisa-pętla-helisa (tzw. bHLH, ang. *basic-helix-loop-helix*), zaś TEF-1 jest członkiem rodziny czynników transkrypcyjnych TEA/ATTS [110, 111]. Dopiero po utworzeniu kompleksu Max z TEF-1 dochodzi do związania motywu EM i aktywacji transkrypcji. Wiadomo obecnie, że TEF-1 jest niezbędny dla prawidłowego rozwoju mięśnia sercowego, albowiem uszkodzenie

lub usunięcie genu TEF-1 prowadzi do śmierci zarodka na skutek nieprawidłowego rozwoju komory sercowej [112]. Wykazano, że ekspresja genu β -MHC, podobnie do α -MHC, jest pozytywnie regulowana za pośrednictwem sąsiadujących ze sobą sekwencji E-box i M-CAT, wiążących bliżej nieokreślone białko z nadrodziny bHLH i TEF-1 [103]. Ponadto samodzielnie występujący motyw E-box (tzn. bez M-CAT) zaangażowany jest w regulację transkrypcji genów sercowych izoform ALC-1 i VLC-2, łańcuchów ciężkich miozyny mięśni gładkich oraz genu MHC-IIa mięśni szkieletowych [97, 101, 113, 114]. W regionie promotora genu ALC-1 wykryto aż 4 motywy E-box, z których tylko dwa są krytyczne dla regulacji ekspresji [97]. W komórkach mięśni szkieletowych z motywem E-box wiążą się specyficzne czynniki transkrypcyjne z rodziny MyoD, takie jak MyoD, miogenina, myf-5 i MRF-4 (nazywany też herkulina lub myf-6), należące do nadrodziny białek bHLH [115, 116]. Czynniki te są specyficznie ekspresjonowane w mięśniach szkieletowych i nie występują w żadnym innym typie mięśni [117, 118]. W związku z tym uważa się, że białka z rodziny MyoD są odpowiedzialne za tkankowo-specyficzną ekspresję izoform miozyny w mięśniach szkieletowych. Wiązanie z motywem E-box i stymulacja transkrypcji odpowiednich genów następują dopiero po utworzeniu kompleksu białka z rodziny MyoD z powszechnie występującym czynnikiem z nadrodziny białek bHLH, takim jak E12 lub E47 [119]. Ostatnio wykazano, że ekspresja białek z rodziny MyoD jest wrażliwa na unerwienie motoryczne mięśnia szkieletowego [120-122]. Stymulacja elektryczna oraz krzyżowe unerwienie różnych typów mięśni szkieletowych prowadzi do zmian w poziomie ekspresji MyoD i miogeniny. Ponadto zaobserwowano, że białko MyoD występuje głównie w mięśniach szybkich, zaś miogenina w wolnych [123]. Jak wskazują badania, ekspresja MyoD i miogeniny regulowana jest przez hormon tarczycy. Można zatem przypuszczać, że białka z rodziny MyoD biorą udział w determinacji typu włókna podczas miogenezy, jak i modulują wzór ekspresji izoform miozyny w dojrzałych mięśniach szkieletowych.

Kolejnym elementem sekwencyjnym występującym w regionie promotorowym genów kodujących sercowe izoformy: α -MHC, β -MHC, ALC-1 i VLC-1 jest specyficzny motyw sekwencyjny GATA [124-127]. Związanie białka GATA-4 przez ten motyw prowadzi do stymulacji ekspresji genu. Białko GATA-4 jest specyficznie ekspresjonowane w mięśniu sercowym i nie jest wykrywane w mięśniach innych typów. Niemniej, motyw sekwencyjny GATA wykryto także w regionie promotorowym genu MLC-1F/-3F [128]. Stymulacja transkrypcji tego genu w mięśniach szkieletowych odbywa się jednak przy udziale izoformy białka GATA innej niż GATA-4, być może GATA-2 lub GATA-3, gdyż te izoformy występują w mięśniach szkieletowych.

Czynnikiem transkrypcyjnym ekspresjonowanym na wysokim poziomie w mięśniach wszystkich typów jest MEF-2 (ang. *myocyte enhancer binding factor-2*) [129-131]. Wykazano, że związanie białka MEF-2 z sekwencją CTA(A/T)₄TAA regionu promotorowego stymuluje ekspresję genu α -MHC w mięśniu sercowym, genu MLC-1F/-3F w mięśniach szkieletowych i prawdopodobnie genu SMMHC w mięśniach gładkich [114, 128, 131, 132]. MEF-2 współdziała z białkami bHLH podczas aktywacji ekspresji genów mięśniowych [129]. MEF-2 może wiązać się z kompleksem MyoD/E12 w komórkach mięśni szkieletowych i regulować ekspresję genów miozyny, znajdujących się pod kontrolą motywu E-box lub/i motywu wiążącego MEF-2. MEF-2 uważany jest za wczesny marker aktywacji programu różnicowania mięśnia. Dowiedziano bowiem, że bierze on udział w stymulacji ekspresji genu miogeniny [133].

Niewiele wiadomo na temat elementów sekwencyjnych regulujących w sposób negatywny ekspresję genów miozynowych. W obrębie regionu promotorowego genu SMMHC wykryto motyw CCCGCCC tzw. GC-box wiążący białko Sp1 [100]. Związanie Sp1 przez tą sekwencję powoduje zahamowanie ekspresji genu SMMHC. W regionie promotorowym genu VLC-2 wykryto tzw. element CSS, sekwencję sercowo-specyficzną (ang. *cardiac specific sequence*), zawierającą motywy GAAG/CTTC [134]. Z sekwencją tą mogą wiązać się białka CSSBP1 i CSSBP2. Oba białka występują w dorosłych mięśniach szkieletowych, zaś w mięśniu sercowym jedynie białko CSSBP1. Doświadczenia wykazały, że dla zahamowania ekspresji genu VLC-2 niezbędna jest obecność obu białek, a zatem represja transkrypcji genu VLC-2 może zachodzić za pośrednictwem elementu CSS tylko w mięśniach szkieletowych.

VI. Uwagi końcowe

W komórkach mięśnia sercowego, szkieletowego i gładkiego ulegają ekspresji wielogenowe rodziny izoform łańcuchów lekkich i ciężkich miozyny. Ekspresja tych izoform charakteryzuje się wysoką tkankową specyficznością. Występowanie niektórych izoform miozyny ograniczone jest nie tylko do danego typu mięśnia, lecz także do specyficznych regionów mięśnia np.: komory lub przedsionka mięśnia sercowego, włókien szybkich lub wolnych mięśnia szkieletowego. Wzór ekspresji izoform miozyny jest ponadto specyficzny dla poszczególnych etapów rozwoju mięśnia. Przeprowadzone w ciągu ostatnich lat badania doprowadziły do odkrycia wielu motywów sekwencyjnych i czynników transkrypcyjnych, zaangażowanych w regulację ekspresji genów miozyny. Wciąż jednak jesteśmy dalecy od pełnego poznania mechanizmów odpowiedzialnych za specyficzną ekspresję tych genów. Wiele różnych genów kodujących izoformy łańcuchów lekkich i ciężkich miozyny posiada wspólne

motywy sekwencyjne regulujące ich transkrypcję. Wydaje się zatem, że za selektywną ekspresję różnych izoform miozyny odpowiedzialne są, ekspresjonowane specyficznie w mięśniu danego typu, czynniki transkrypcyjne oraz współdziałanie kilku różnych motywów sekwencyjnych regionu promotorowego. Znajomość motywów sekwencyjnych i mechanizmów odpowiedzialnych za regulację ekspresji genów miozyny stanowi podstawę dla prowadzonych obecnie badań mających na celu opracowanie terapii genowej schorzeń mięśnia sercowego [135, 136].

Podziękowanie

Serdecznie dziękuję Doc. dr hab. Dariuszowi Stępkowskiemu za cenne uwagi podczas przygotowywania niniejszego artykułu.

Artykuł otrzymano 21 września 1998 r.

Zaakceptowano do druku 3 października 1998 r.

Piśmiennictwo

1. Dąbrowska R (1994) *Post Biochem* **40**: 96-105
2. Warrick HM, Spudich JA (1987) *Annu Rev Cell Biol* **3**: 379-421
3. Schiaffino S, Reggiani C (1994) *J Appl Physiol* **77**: 493-501
4. Mahdavi V, Strehler EE, Periasamy M, Wieczorek D, Izzumo S, Grund S, Strehler MA, Nadal-Ginard B (1986) W: Emerson C (red) *Molecular Biology of Muscle Development*, Alan R Liss, New York, str. 345-361
5. Nguyen HT, Gubits RM, Wydro RM, Nadal-Ginard B (1982) *Proc Natl Acad Sci USA* **79**: 5230-5234
6. Weydert A, Daubas P, Lazaridis I, Barton P, Garner I, Leader D, Bonhomme F, Catalan J, Simon D, Guenet J, Gros F, Buckingham M (1985) *Proc Natl Acad Sci USA* **82**: 7183-7187
7. Babij P, Periasamy M (1989) *J Mol Biol* **210**: 673-679
8. Robert B, Daubas M, Akimenko M, Cohen A, Garner I, Guenet J, Buckingham M (1984) *Cell* **39**: 129-140
9. Whalen RG, Sell SM, Butler-Browne G, Schwartz K, Bouveret P, Pinset-Harstrom (1981) *Nature (Lond)* **292**: 805-809
10. Weydert A, Barton P, Harris AJ, Pinset C, Buckingham M (1987) *Cell* **49**: 121-129
11. Lyons GE, Ontell M, Cox R, Sasson D, Buckingham M (1990) *J Cell Biol* **111**: 1465-1476
12. Buller AJ, Eccles JC, Eccles RM (1960) *J Physiol* **150**: 417-439
13. Pette D, Vrbova G (1985) *Muscle & Nerve* **8**: 676-689
14. Bacou F, Rouanet P, Barjot C, Janmot C, Vigneron P, d'Albis A (1996) *Eur J Biochem* **236**: 539-547
15. Leinwand LA, Fournier REK, Nadal-Ginard B, Shows TB (1983) *Proc Natl Acad Sci USA* **80**: 3716-3720
16. Mahdavi V, Chambers AP, Nadal-Ginard B (1984) *Proc Natl Acad Sci USA* **81**: 2626-2630
17. Saez LJ, Gionola K M, McNally RM, Feghali R, Eddy R, Shows TB, Leinwand LA (1987) *Nucleic Acids Res* **15**: 5443-5359
18. Price KM, Littler WA, Cummins P (1980) *Biochem J* **191**: 571-580
19. Morano I, Bletz C, Wojciechowski R, Ruegg JC (1991) *Circ Res* **68**: 614-618
20. Kurabayashi M, Komuro I, Tsuchimochi H, Takakku F, Yazaki Y (1988) *J Biol Chem* **263**: 13930-13936
21. Barton PJ, Cohen A, Robert B, Fizman MY, Bonhomme F, Guenet J, Leader DP, Buckingham ME (1985) *J Biol Chem* **260**: 8578-8584
22. Schaub MC, Hefti MA, Zuelling RA, Morano

- I (1998) *Cardiovas Res* **37**: 381-404
23. Pette D, Staron RS (1990) *Rev Physiol Biochem Pharmacol* **116**: 1-76
 24. Aigner S, Gohlsch B, Hamaalainen N, Staron RS, Uber A, Wehrle U, Pette D (1993) *Eur J Biochem* **211**: 367-372
 25. Janmot C, d'Albis A (1994) *FEBS Lett* **353**: 13-15
 26. deNardi C, Ausoni S, Moretti P, Gorza L, Velleca M, Buckingham M, Schiaffino S (1993) *J Cell Biol* **123**: 823-835
 27. Lompre AM, Nadal-Ginard B, Mahdavi V (1984) *J Biol Chem* **259**: 6437-6446
 28. Hughes SM, Cho M, Karsch-Mizrachi I, Travis M, Silberstein L, Leinwand LA, Blau HM (1993) *Dev Biol* **158**: 183-199
 29. Weydert A (1988) *Bull Onst Pasteur* **86**: 159-210
 30. Rushbrook JI, Weiss C, Ko K, Feuerman MH, Carleton S, Ing A, Jacoby J (1994) *J Muscle Res Cell Motil* **15**: 505-515
 31. d'Albis A, Anger M, Lompre AM (1993) *FEBS Lett* **324**: 178-180
 32. Periasamy M, Strehler EE, Garfinkel LI, Gubits RM, Ruiz-Opazo N, Nadal-Ginard B (1984) *J Biol Chem* **259**: 13595-13604
 33. Kevin JL, Ross RS, Rockman HA, Harris AN, O'Brien TX, van Bilsen M, Shubeita HE, Kandolf R, Brem G, Price J, Evans SM, Zhu H, Franz WM, Chien KR (1992) *J Biol Chem* **267**: 15875-15885
 34. Swynghedauw B (1986) *Physiol Rev* **66**: 710-774
 35. Matsuda G, Maita T, Umegane T (1981) *FEBS Lett* **126**: 111-113
 36. Nagai R, Kuro-o M, Babij P, Periasamy M (1989) *J Biol Chem* **264**: 9734-9737
 37. White S, Martin AF, Periasamy M (1993) *Am J Physiol* **264**: C1252-C1258
 38. Kelley CA, Adelstein RS (1994) *Can J Physiol Pharmacol* **72**: 1351-1360
 39. Kuro-o M, Nagai R, Nakahara K, Katoh H, Tsai RC, Tsuchimochi H, Yazaki Y, Ohkubo A, Takaku F (1991) *J Biol Chem* **266**: 3768-3773
 40. Katsuragawa Y, Yanagisawa M, Inoue A, Masaki T (1989) *Eur J Biochem* **184**: 611-616
 41. Simons M, Wang M, McBride OW, Kawamoto S, Yamakawa K, Gdula D, Adelstein RS, Weir L (1991) *Circ Res* **69**: 530-539
 42. Miano J, Cserjesi P, Ligon K, Periasamy M, Olson EN (1994) *Circ Res* **75**: 803-812
 43. Helper DJ, Lash JA, Hathaway DR (1988) *J Biol Chem* **263**: 15748-15753
 44. Matsuda G, Maita T, Kato Y, Chen J, Umegane T (1981) *FEBS Lett* **135**: 232-236
 45. Nabeshima Y, Nabeshima Y, Nonomura Y, Fujii-Kuriyama Y (1987) *J Biol Chem* **262**: 10608-10612
 46. Kumar CC, Mohan SR, Zavadny PJ, Narula SK, Leibowitz PJ (1989) *Biochemistry* **28**: 4027-4035
 47. Whalen RG, Butler-Browne G, Gros F (1978) *J Mol Biol* **126**: 415-431
 48. Barton P, Harris A, Buckingham M (1989) *Development* **107**: 819-824
 49. Narusawa M, Fitzsimons RB, Izumo S, Nadal-Ginard B, Rubinstein NA, Kelly AM (1987) *J Cell Biol* **104**: 447-459
 50. Izumo S, Nadal-Ginard B, Mahdavi V (1986) *Science* **231**: 597-600
 51. d'Albis A, Janmot C, Bechet JJ (1986) *Eur J Biochem* **156**: 291-296
 52. Wiczorek DF, Periasamy M, Butler-Browne GS, Whalen RG, Nadal-Ginard B (1985) *J Cell Biol* **101**: 618-629
 53. Barton PJR, Robert B, Cohen A, Garner I, Sassoon D, Weydert A, Buckingham ME (1988) *J Biol Chem* **263**: 12669-12676
 54. Whalen RG, Johnston D, Bryers PS, Butler-Browne GS, Ecob MS, Jaros E (1984) *FEBS Lett* **177**: 51-56
 55. Whalen RG, Schwartz K, Bouveret P, Sell SM, Gros F (1979) *Proc Natl Acad Sci USA* **76**: 5197-5201
 56. O'Brien TX, Lee KJ, Chien KR (1993) *Proc Natl Acad Sci USA* **90**: 5157-5161
 57. Lyons GE, Schiaffino S, Sassoon D, Barton P, Buckingham M (1990) *J Cell Biol* **111**: 2427-2436
 58. Kubalak SW, Miller-Hance WC, O'Brien TX, Dyson E, Chien KR (1994) *J Biol Chem* **269**: 1691-1697
 59. Borrione AC, Zanellato AM, Scannapieco G, Pauletto P, Sartore S (1989) *Eur J Biochem* **183**: 413-417
 60. Frid MG, Printeva OY, Chiavegato A, Faggin E, Scatena M, Koteliensky VE, Pauletto P, Glukhova MA, Sartore S (1993) *J Vasc Res* **30**: 279-292
 61. Nagai R, Kuro-o M, Babij P, Periasamy M (1989) *J Biol Chem* **264**: 9734-9737
 62. Kuro-o M, Nagai R, Tsuchimochi H, Katoh H, Yazaki Y, Ohkubo A, Takaku F (1989) *J Biol Chem* **264**: 18272-18275
 63. Sakurai H, Matsuoka R, Furutani Y, Imamura S, Takao A, Momma K (1996) *Eur J Cell Biol* **69**: 166-176
 64. Eccles JC (1967) W: Milhorat AT (red) Exploratory concepts in muscular dystrophy and related disorders Excerpta Medica Foundation, Amsterdam, str 151-160
 65. Hennig R, Lomo T (1985) *Nature (Lond)* **314**: 164-166
 66. Lomo T, Westgaard RH, Dahl HA (1974) *Proc R Soc Lond B Biol Sci* **187**: 99-103
 67. Salmons S, Sreter FA (1976) *Nature (Lond)* **263**: 30-34
 68. Gauthier GF, Burke RE, Lowey S, Hobbs AW (1983) *J Cell Biol* **97**: 756-771
 69. Ausoni S, Gorza L, Schiaffino S, Gundersen K, Lomo T (1990) *J Neurosci* **10**: 153-160
 70. Mira JC, Janmot C, Couteaux R, d'Albis A (1992) *Neurosci Lett* **141**: 223-226
 71. Termin A, Pette D (1992) *Eur J Biochem* **204**: 569-573
 72. Barjot C, Rouanet P, Vigneron P, Janmot C, d'Albis A, Bacou T (1998) *J Muscle Res Cell Motil* **19**: 25-32
 73. d'Albis A, Goubel F, Couteaux R, Janmot C, Mira JC (1994) *Eur J Biochem* **223**: 249-258
 74. Goldspink G, Scutt A, Martindale J, Jaenicke T, Turaay L, Gerlach CF (1991) *Biochem Trans* **19**: 368-373
 75. Goldspink G, Scutt A, Loughna PT, Wells DJ, Jaenicke T, Gerlach GF (1992) *Am J Physiol* **262**: R356-R363
 76. Periasamy M, Gregory P, Martin BJ, Stirewalt WS (1989) *Biochem J* **257**: 691-698
 77. Gambke B, Lyons GE, Haselgrove J, Kelly A, Rubinstein NA (1983) *FEBS Lett* **156**: 335-339
 78. Finkelstein DI, Andrianakis P, Luff AR, Walker D (1991) *Am J Physiol* **261**: R1300-R1306
 79. Caiozzo VJ, Herrick RE, Baldwin KM (1991) *Am J Physiol* **261**: C285-C295
 80. Li X, Larsson L (1997) *J Muscle Res Cell Motil* **18**: 335-344
 81. Izumo S, Lompre A, Matsuoka R, Koren G, Schwartz K, Nadal-Ginard B, Mahdavi V (1987) *J Clin Invest* **79**: 970-977
 82. Imamura SI, Matsuoka R, Hiratsuka E, Limura M, Nakanishi T, Nishikawa T, Furutani Y, Takao A (1991) *Am J Physiol* **260**: H73-H79
 83. Ackland LM, Lambert SJ, Cummins P (1986) *Cardiovas Res* **20**: 828-863
 84. Hirzel HO, Tuchschnid CR, Schneider J, Krayenbuehl HP, Schaub MC (1985) *Circ Res* **57**: 729-740
 85. Sutsch G, Brunner UT, Von Schulthess C, Hirzel HO, Hess OM, Turina M, Krayenbuehl HP, Schaub MC (1992) *Circ Res* **70**: 1034-1035
 86. Schiaffino S, Reggiani C (1996) *Physiol Rev* **76**: 371-423
 87. Gustafson TA, Markham BE, Morkin E (1986) *Circ Res* **59**: 194-201
 88. Lompre AM, Nadal-Ginard B, Mahdavi V (1984) *J Biol Chem* **259**: 6437-6446
 89. Imamura S, Sakurai H, Takao A, Matsuoka R (1992) *Circulation* **86**: Suppl I 830
 90. Capriani A, Chiavegato A, Franch R, Azzarello G, Vinante O, Sartore S (1997) *J Muscle Res Cell Motil* **18**: 413-427
 91. Miwa T, Kedes L (1987) *Mol Cell Biol* **7**: 2803-2813
 92. Mohun TJ, Taylor MV, Garret N, Gurdon JB (1989) *EMBO J* **8**: 1153-1161

93. Papadopoulos N, Crow M (1993) *Mol Cell Biol* **13**: 6907-6918
94. Tuil D, Clerque N, Montarras D, Pinset C, Kahn A, Phan-Dinh-Tuy F (1990) *J Mol Biol* **213**: 677-686
95. Uetsuki Y, Nabeshim Y, Fujisawa-Sehara A, Nabeshim YI (1990) *Mol Cell Biol* **10**: 2562-2569
96. Molkenkin JD, Jobe SM, Markham BE (1996) *J Mol Cell Cariol* **28**: 1211-1225
97. Catala F, Wanner R, Barton P, Cohen A, Wright W, Buckingham M (1995) *Mol Cell Biol* **15**: 4585-4596
98. Minty A, Kedes L (1986) *Mol Cell Biol* **6**: 2125-2136
99. Ernst H, Walsh K, Harrison CA, Rosenthal N (1991) *Mol Cell Biol* **11**: 3735-3744
100. Madsen CS, Hershey JC, Hautmann MB, White SL, Owens GK (1997) *J Biol Chem* **272**: 6332-6340
101. Chang Kc, Fernandes K, Dauncey MJ (1995) *J Cell Sci* **108**: 1779-1789
102. Treisman R (1986) *Cell* **46**: 567-574
103. Flink IL, Edwards JG, Bahl JJ, Liew CC, Sole M, Morkin E (1992) *J Biol Chem* **267**: 9917-9924
104. Ruogian S, Goswami SK, Mascareno E, Kumar A, Siddiqui MAQ (1991) *Mol Cell Biol* **11**: 1676-1685
105. Minty A, Kedes L (1986) *Mol Cell Biol* **6**: 6125-6136
106. Mar JH, Ordahl CP (1990) *Mol Cell Biol* **10**: 4271-4283
107. Gupta MP, Gupta M, Zak R (1994) *J Biol Chem* **269**: 29677-29687
108. Lassar AB, Buskin JN, Lockson D, Davis RL, Apone S, Hauschka SD, Weintraub H (1989) *Cell* **58**: 823-831
109. Gupta MP, Amin CS, Gupta M, Hay N, Zak R (1997) *Mol Cell Biol* **17**: 3924-3936
110. Blackwood EM, Eisenman RN (1991) *Science* **251**: 1211-1217
111. Burglin TR (1991) *Cell* **66**: 11-12
112. Chen Z, Friedrich GA, Soriano P (1994) *Genes Dev* **8**: 2293-2301
113. Navankasattusas S, Sawadogo M, Van Bilsen M, Dang CV, Chien KR (1994) *Mol Cell Biol* **14**: 7331-7339
114. Katoh Y, Loukianov E, Koprass E, Zilberman A, Periasamy M (1994) *J Biol Chem* **269**: 30538-30545
115. Olson EN (1990) *Genes Dev* **4**: 1454-1461
116. Weintraub H, Davis R, Tapscott S, Thayer M, Krause M, Benezra R, Blackwell T, Turner D, Rupp R, Hollenberg S, Zhuang Y, Lassar A (1991) *Science* **251**: 761-766
117. Davis LR, Weintraub H, Lassar AB (1987) *Cell* **51**: 987-1000
118. Sassoon D, Lyons G, Wright WE, Lin V, Lassar A, Weintraub H, Buckingham M (1989) *Nature (Lond)* **341**: 303-307
119. Murre C, McCaw PS, Vaessin H, Caudy M, Jan LY, Jan YN, Cabrera CV, Buskin JN, Hauschka SD, Lassar AB, Weintraub H, Baltimore D (1989) *Cell* **58**: 537-544
120. Saitoh O, Fujisawa-Sehara A, Nabeshima Y, Periasamy M (1993) *Nucleic Acids Res* **21**: 2503-2509
121. Witzemann V, Sakmann B (1991) *FEBS Lett* **282**: 259-264
122. Eftimie R, Brenner HR, Buonanno A (1991) *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 1349-1353
123. Hughes SM, Taylor JM, Tapscott SJ, Gurley CM, Carter WJ, Peterson CA (1993) *Development* **118**: 1137-1147
124. Molkenkin JD, Kalvakolanu DV, Markham BE (1994) *Mol Cell Biol* **14**: 4947-4957
125. Thompson WR, Nadal-Ginard B, Mahdavi V (1991) *J Biol Chem* **266**: 22678-22688
126. Cohen A, Barton PJR, Robert B, Garner I, Alanso S, Buckingham ME (1988) *Nucleic Acids Res* **16**: 10037-10052
127. Lyons GE, Schiaffino S, Sassoon D, Barton P, Buckingham M (1990) *J Cell Biol* **111**: 2427-2436
128. McGrew M, Bogdanova N, Hasegawa K, Hughes SH, Kitsis RN, Rosenthal N (1996) *Mol Cell Biol* **16**: 4524-4534
129. Molkenkin JD, Black BL, Martin JF, Olson EN (1995) *Cell* **83**: 1125-1136
130. Sassoon D (1993) *Dev Biol* **156**: 11-23
131. Gossett LA, Kelvin DJ, Sternberg EA, Olson EN (1989) *Mol Cell Biol* **9**: 5022-5033
132. Molkenkin JD, Markham BE (1993) *J Biol Chem* **268**: 19512-19520
133. Edmondson DG, Cheng T-C, Cserjesi P, Chakraborty T, Olson EN (1992) *Mol Cell Biol* **12**: 3665-3677
134. Dhar M, Mascareno EM, Siddiqui MAQ (1997) *J Biol Chem* **272**: 18490-18497
135. Murry CE, Kay MA, Bartosek T, Hauschka SD, Schwartz SM (1996) *J Clin Invest* **98**: 2209-2217
136. Franz WM, Rothmann T, Frey N, Katus HA (1997) *Cardiovasc Res* **35**: 560-566

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

Drogi przekazywania sygnału przez czynnik wzrostu nerwów (NGF) i jego receptory TrkA i p75^{NTR}

Signal transduction of the nerve growth factor (NGF) by TrkA and p75^{NTR} receptors

GRAŻYNA NIEWIADOMSKA¹,
MACIEJ MAŁECKI²

Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Struktura biochemiczna NGF warunkuje jego właściwości sygnałowe
- III. Receptory NGF — białka błonowe o wysokim i niskim powinowactwie wiązania liganda
 - III-1. Receptor o aktywności kinazy tyrozynowej — TrkA
 - III-2. Receptor p75^{NTR}
- IV. Zdarzenia wewnątrzkomórkowe
 - IV-1. Przekazywanie sygnału przez receptor TrkA
 - IV-2. Przekazywanie sygnału przez receptor p75^{NTR}
- V. Receptor p75^{NTR} moduluje funkcję troficzną receptora TrkA
- VI. Podsumowanie

Wykaz stosowanych skrótów: NGF — czynnik wzrostu nerwów; p75^{NTR} — receptor neurotrofin o niskim powinowactwie do liganda; TrkA — receptor NGF o aktywności kinazy tyrozynowej; kDa — kilodalton; TNF — czynnik martwicy nowotworu; NF-κB — jądrowy czynnik transkrypcyjny; JNK — N-końcowe kinazy Jun; PLC — fosfolipaza C; IP3 — inozytolo (1,4,5) trifosforan; PIP2 — fosfatydyloinozytolo (4, 5) bisfosforan; DAG — diacylglicerol; PKC — kinaza białkowa C; PI-SK — 3-kinaza fosfatydyloinozytolo; Akt — serynowo treoninowa kinaza Akt (produkt protoonkogenu *c-akt*); DAP — kinaza białkowa zależna od jonów Ca²⁺ i kalmoduliny; PP3 — fosfatydyloinozytolo (3, 4, 5) trifosforan; Shc — białko adaptorowe; Grb 2 — białko związane z receptorem czynników wzrostu; Sos — czynnik wymieniający nukleotydy guaninowe; GTP — guanozynotrifosforan; GDP — guanozynydifosforan; Ras — rodzina białek onkogennych; Raf — kinaza serynowo treoninowa; MEK — kinaza kinazy MAP-Erk; MAPK — kinaza białkowa aktywowana przez mitogeny; CREB — czynnik transkrypcyjny aktywowany na drodze fosforylacji przez kinazę białkową A; CRE — regulatorowe sekwencje DNA wiążące czynniki transkrypcyjne aktywowane na drodze fosforylacji przez fosfokinazę A i warunkujące odpowiedź na cAMP; SRF (ang. *serum responsive factor*) — czynnik transkrypcyjny; SRE (ang. *serum responsive element*) — regulatorowe sekwencje DNA wiążące czynniki transkrypcyjne; Elk1 — czynnik transkrypcyjny; IEG (ang. *immediate early genes*) — geny wczesnej odpowiedzi komórkowej; IEG-RE (ang. *immediate early genes responsive element*) — sekwencje

Contents:

- I. Introduction
- II. Biochemical structure of NGF implicates its signaling properties
- III. NGF receptors — membrane proteins of high and low binding affinity of ligand
 - III-1. Tyrosine kinase receptor TrkA
 - III-2. p75^{NTR} receptor
- IV. Intracellular events
 - IV-1. TrkA signal transduction
 - IV-2. p75^{NTR} signal transduction
- V. p75^{NTR} modulates TrkA trophic function
- VI. Conclusions

regulatorowe genów wczesnej odpowiedzi komórkowej; DRG (ang. *delayed response genes*) — geny odroczonej odpowiedzi komórkowej; pIEG (ang. *protein product of IEG*) — białkowe produkty genów wczesnej odpowiedzi komórkowej.

I. Wstęp

Czynnik wzrostu nerwów (NGF, ang. *nerve growth factor*) jest jedną z wielu substancji sygnałowych w obwodowym i ośrodkowym układzie nerwowym, określanych jako substancje neurotrophiczne. Wraz z pochodzącym z mózgu czynnikiem neurotroficznym (BDNF, ang. *brain derived neurotrophic factor*) oraz neurotrofinami 3 (NT-3), 4 5 (NT-4 5), 6 (NT-6) i 7 (NT-7) (obecności ostatnich dwu nie stwierdzono u ssaków) stanowi rodzinę tzw. klasycznych neurotrofin [1, 2]. W obwodowym układzie nerwowym NGF działa jako substancja sygnałowa pomiędzy komórkami, które go syntetyzują — komórkami narządów obwodowych — i komórkami, które nań odpowiadają — neuronami zwojów obwodowych. W czasie rozwoju embrionalnego i w okresie postnatalnym NGF wpływa na namnażanie się, migrację, przeżywalność i różnicowanie się komórek nerwowych oraz na wytwarzanie właściwych im połączeń. W naturalnie rozwijającym się układzie nerwowym NGF jest dostępny w ograniczonych ilościach. Rozrastające się zakończenia neuronów obwodowych konkurują ze

¹ Dr, ² mgr, Zakład Neurofizjologii, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN, ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa

sobą o dostęp do substancji troficznej. Ta kompetycja jest jednym z elementów mechanizmu regulującego liczbę neuronów w dojrzewającym układzie nerwowym.

NGF wpływa także na rozwój ośrodkowego układu nerwowego [3]. W mózgu populacją neuronów szczególnie zależną od NGF są neurony cholinergiczne, których substancją przekaźnikową jest acetylocholina (ACh). NGF jest niezbędny do przeżycia i zachowania prawidłowej morfologii tych neuronów nie tylko w czasie rozwoju, ale także w ciągu całego życia [1]. NGF, podawany domózgowo, zapobiega zmianom degeneracyjnym neuronów cholinergicznych po eksperymentalnych uszkodzeniach okolic mózgu, w których leżą te neurony oraz zmianom wywołanym procesem starzenia się [4].

Poza układem nerwowym neurotrofiny pełnią funkcję sygnałową również w układzie hormonalnym i odpornościowym. W ostatnich latach stwierdzono, że do komórek odpowiadających na NGF należą, obok neuronów, także limfocyty, makrofagi, komórki żerne, inne komórki pochodzenia ektodermalnego, np. keratynocyty i melanocyty oraz elementy komórkowe układu hormonalnego [5]. Również liczba doniesień sugerujących, że NGF jest substancją integrującą działanie układu nerwowego, odpornościowego i hormonalnego [5]. W badaniach tych szczególną uwagę zwraca się na komórki żerne. Ich wszechobecność w tkankach, możliwość reagowania na bardzo szeroki zakres bodźców pochodzących ze środowiska oraz ich wrażliwość na NGF stanowią cechy dzięki którym mogą one pośredniczyć w integracji odpowiedzi neuronalnych, hormonalnych i odpornościowych organizmu.

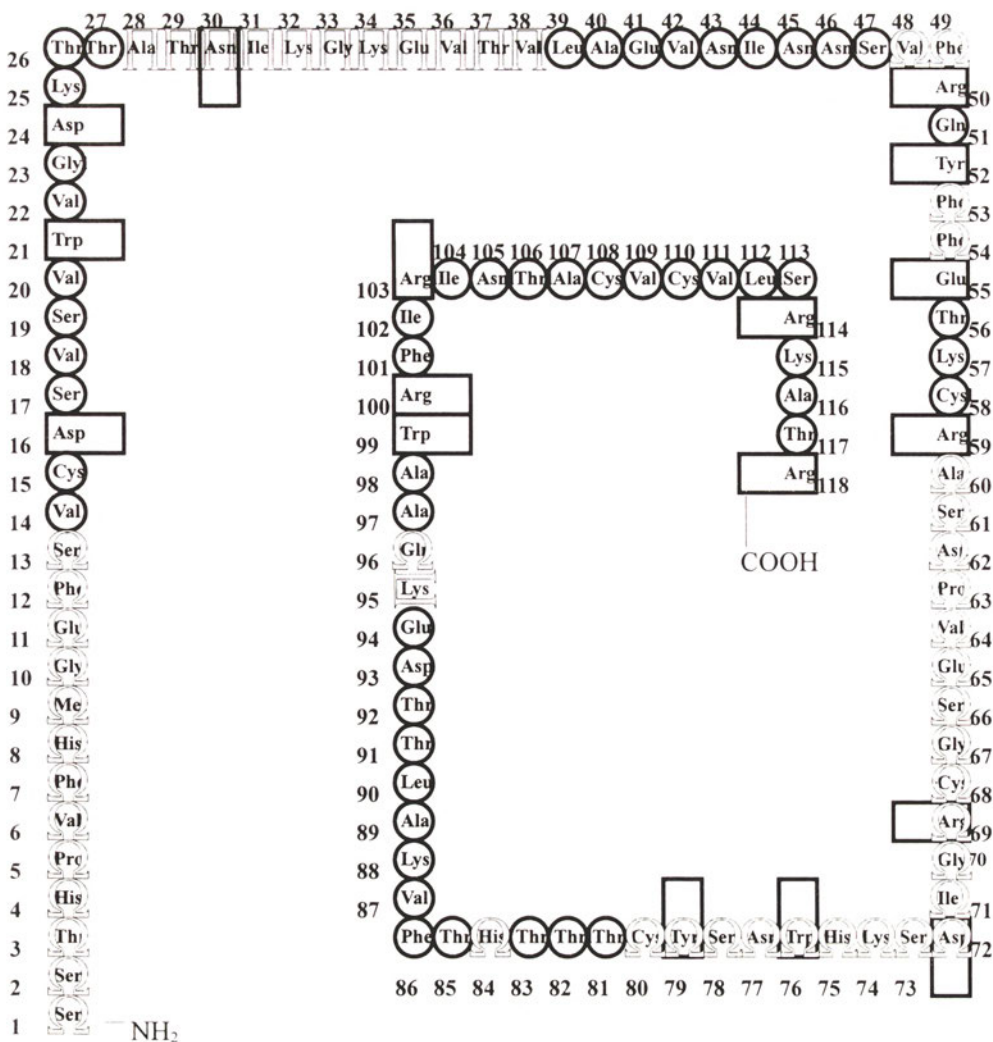
NGF wywiera różnorodne działania regulacyjne poprzez oddziaływanie z obecnymi w błonie cytoplazmatycznej receptorami TrkA (ang. *tyrosine kinase receptor A*) i p75^{NTR} (ang. *p75 neurotrophin receptor*) [6, 7]. Najnowsze badania wskazują, że poszczególne zdarzenia wewnątrzkomórkowe indukowane przez NGF zależą od typu komórek, w których ma to miejsce oraz od sposobu aktywacji receptorów obu typów. Na przykład, aktywacja wyłącznie receptorów TrkA zapewnia przeżywanie komórek nerwowych, indukuje jednak śmierć komórek guzów neuronalnych. Jeżeli zaś dochodzi do indukcji receptora p75^{NTR} pod nieobecność mocnego sygnału pochodzącego od receptorów TrkA, to obserwujemy śmierć neuronów wskutek apoptozy. Natomiast w przypadku, gdy ekspresja receptorów p75^{NTR} i TrkA występuje równocześnie, to sygnał troficzny przekazywany przez receptory TrkA ulega wzmocnieniu [8]. Te różnorodne odpowiedzi wskazują na bardzo złożone zależności występujące pomiędzy regulowanymi przez neurotrofiny mechanizmami warunkującymi przeżywalność, różnicowanie i śmierć komórek nerwowych. Mechanizmy przekazywania sygnałów w komórce przez NGF i jego receptory, które leżą u podstawy wymienionych procesów są przedmiotem niniejszej monografii.

II. Struktura biochemiczna NGF warunkuje jego właściwości sygnałowe

Czynnik wzrostu nerwów jest białkiem, którego cząsteczka składa się z trzech podjednostek — α , β i γ (stechiometria: $\alpha 2$ - β - $\gamma 2$) o łącznej masie cząsteczkowej 130 kDa. Stała sedymentacji tego kompleksu wynosi 7S. Natywny kompleks 7S syntetyzowany jest jedynie w śliniankach podżuchwowych samców myszy [9]. U zwierząt innych gatunków występuje niepełna forma NGF w postaci podjednostki β . Aktywność troficzna NGF związana jest wyłącznie z tą podjednostką. β -NGF jest dimerem o łącznej masie cząsteczkowej 26,5 kDa [10], zbudowanym z dwóch identycznych łańcuchów aminokwasowych (118 aminokwasów w każdym), połączonych tzw. węzłami cysteinowymi (Ryc. 1). Monomery β -NGF są syntetyzowane jako duże cząsteczki prekursorowe, które następnie „dojrzewają” w cytoplazmie komórki do postaci biologicznie czynnej. Sekwencja nukleotydowa DNA, kodującego cząsteczki prekursora NGF została poznana u wielu gatunków zwierząt oraz u człowieka. Wysoki stopień identyczności tych sekwencji świadczy o dużym konserwatyźmie ewolucyjnym NGF. NGF zawiera trzy pary antyrównoległych β -włókien powiązanych wydłużonymi, skręconymi pętlami o strukturze spinki do włosów (ang. β -hairpin) [11-13]. Właściwości troficzne β -NGF zależą od jego struktury trzeciorzędowej, zawierającej trzy mostki dwusiarczkowe. Chemiczne zredukowanie mostków siarczkowych znosi aktywność biologiczną β -NGF.

Sekwencja aminokwasowa NGF zawiera specyficzne fragmenty — domeny — łańcucha odpowiedzialne za rozpoznanie receptora, za stabilizację układu ligand-receptor, wreszcie za ekspresję przenoszonej przez NGF informacji [11, 14]. Uważa się, iż za stabilizację cząsteczki NGF odpowiedzialne są głównie aminokwasy aromatyczne. Stabilizację dimeru zapewniają przede wszystkim Tyr w pozycji 52 i 79 oraz Trp w pozycji 21, 76 i 99 [11]. Na powierzchni cząsteczki NGF występuje również siedem reszt argininowych. Badania wskazują, że odgrywają one głównie rolę strukturalną i podobnie jak aminokwasy aromatyczne biorą udział w stabilizacji cząsteczki NGF. Nie stwierdzono udziału reszt argininowych w interakcjach z receptorami [15]. Funkcję strukturalną pełnią również trzy reszty asparaginianowe — Asp 16, 30, 72 oraz reszta kwasu glutaminowego w pozycji 55. Modyfikacje reszt asparaginianowych na drodze ukierunkowanej mutagenety potwierdzają, iż stabilizację cząsteczki zapewniają również reszty Asp 24 i 30 [15, 16].

Z ośmiu reszt lizynowych występujących w cząsteczce NGF i umieszczonych na jej szczycie, lizyny zajmujące pozycje 32, 34 i 95 biorą udział w wiązaniu NGF z receptorem p75^{NTR}. Modyfikacje tych reszt powodowały zmiany powinowactwa wiązania NGF z receptorem p75^{NTR} bez zmiany jego biologicznej aktywności [15]. Na podstawie badań, w których



Ryc. 1. Schematyczna ilustracja pierwszorzędowej struktury biochemicznej monomeru podjednostki β . warunkującej troficzną aktywność czynnika wzrostu nerwów. Literowe oznaczenia aminokwasów zgodnie są z międzynarodowym kodem biochemicznym.

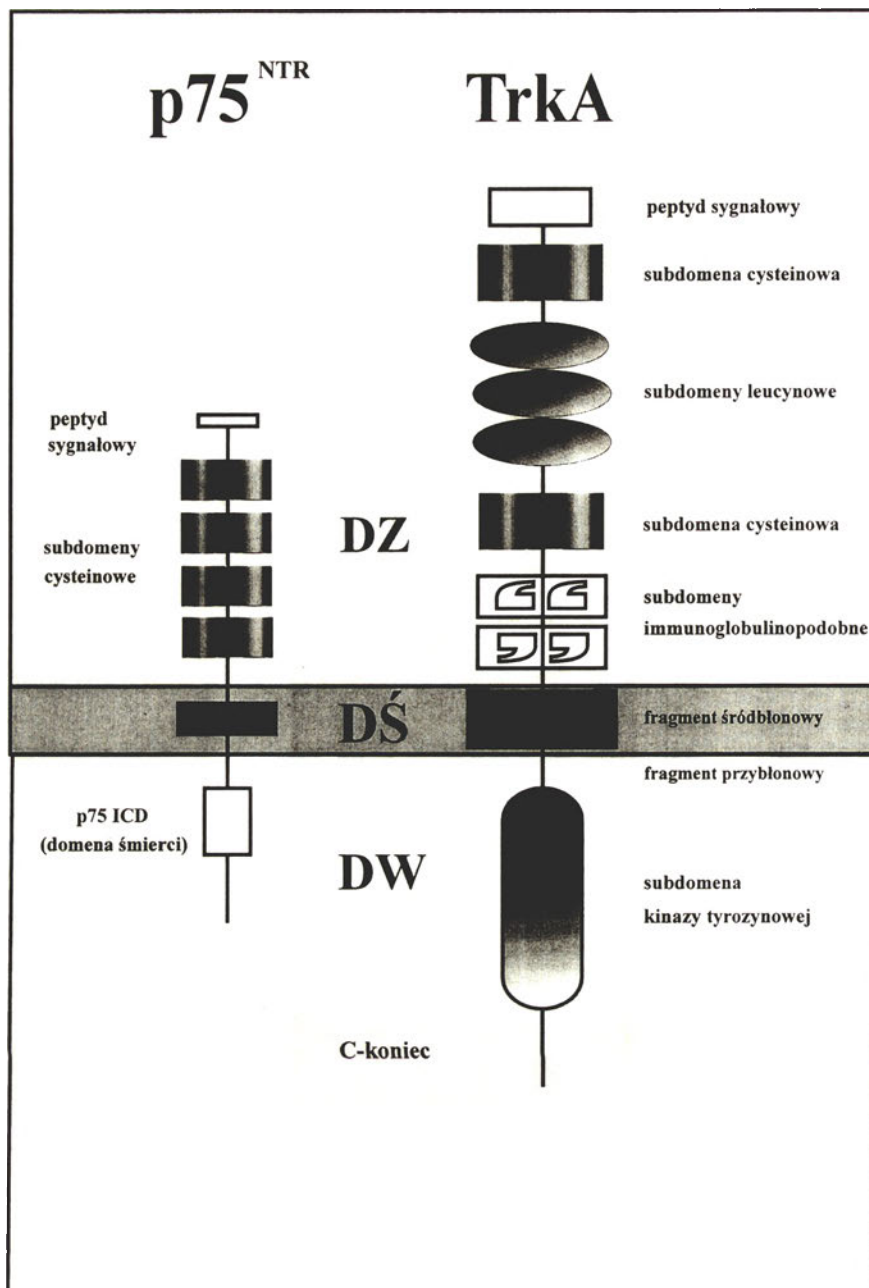
używano syntetycznych peptydów do blokowania aktywności NGF uważa się, że region od 28 do 38 aminokwasu odgrywa istotną rolę w interakcji NGF z receptorem $p75^{NTR}$ [17].

Spośród reszt histydynowych na uwagę zasługuje histydyna w pozycji 84, która leży w regionie cząsteczki NGF odpowiedzialnym za wiązanie z receptorem TrkA [18]. Na powierzchni NGF znajdują się dwa ściśle ograniczone miejsca odpowiedzialne za wiązanie i aktywację receptora TrkA [19]. Pierwszy motyw zbudowany jest z Val 48, Pro 49 i Glu 96 i znajduje się na szczycie dwóch β -pętli. Drugi motyw jest usytuowany w proksymalnej części N-końca i zawiera Pro 5 i Phe 7. Okazuje się, że w wiązaniu i aktywacji TrkA przez NGF ważne są również reszty fenyloalaninowe — Phe 53 i Phe 54. Stosując zrekombinowane formy ludzkiego NGF, które zamiast wspomnianych fenyloalanin zawierały alaniny, udowodniono [20], iż biologiczna aktywność tak zmodyfikowanego NGF i fosforylacja receptorów TrkA po jego związaniu jest

niższa niż w normalnych warunkach. Według kilku doniesień [21, 22] początkowe reszty (1-9 i 9-13 lub 1-10, w zależności od autorów) N-końca cząsteczki NGF są istotne dla utrzymania zdolności wiązania NGF z receptorami TrkA. Jednak zwraca się uwagę na to, iż C-koniec oraz pętla na powierzchni NGF, zawierająca reszty od 60 do 80 są także ważne dla wiązania NGF z receptorami TrkA [23].

III. Receptory NGF — białka błonowe o niskim i wysokim powinowactwie wiązania liganda

Analiza biochemiczna i farmakologiczna białek błonowych wiążących NGF pozwala wyróżnić dwa typy jego receptorów [24]. Identyfikuje się receptory o niskim i o wysokim powinowactwie do NGF. Są to odpowiednio receptory: $p75^{NTR}$, który wiąże niespecyficznie także pozostałe neurotrofiny oraz TrkA, który wiąże specyficznie NGF. Ogólny schemat budowy obu



Ryc. 2. Schemat ilustrujący budowę receptorów NGF. p75^{NTR} — receptor o niskim powinowactwie do NGF; TrkA — receptor o wysokim powinowactwie do NGF (o aktywności kinazy tyrozynowej); DZ — domena zewnętrzkomórkowa; DŚ — domena śród błonowa; DW — domena wewnętrzkomórkowa (cytoplazmatyczna); p75 ICD (ang. *intracellular domain*) — wewnętrzkomórkowy motyw receptora p75^{NTR} zawierający domę śmierci.

typów receptorów jest podobny. Wyróżnia się tu trzy domeny: zewnętrzkomórkową, śród błonową i wewnętrzkomórkową, czyli cytoplazmatyczną.

Obszerną charakterystykę receptorów nurotrofin, w tym także receptorów NGF, zawierają dwa polskojęzyczne opracowania opublikowane w 1997 roku [25, 26]. W związku z tym w niniejszym rozdziale przytoczono jedynie informacje niezbędne do dalszych rozważań.

III-1. Receptor o aktywności kinazy tyrozynowej — TrkA

Receptor TrkA jest produktem protoonkogenu *trk*. Ze względu na swoistą konfigurację receptor TrkA uważany jest za związany z błoną komórkową enzym allosteryczny [27]. Jego domena zewnętrzkomórkowa składa się z pięciu poddomen (Ryc. 2). Wyróżnia się tu poddomeny cysteinowe okalające poddomenę powtórzeń leucynowych oraz dwie poddomeny immuno-

globulinopodobne. Zasadniczą rolę w wiązaniu NGF z receptorem pełni zewnętrzna poddomena immunoglobulinowa, zaś o specyficzności substratowej decyduje poddomena immunoglobulinowa bliższa części śród błonowej [28, 29]. Pojedyncza, hydrofobowa domena śród błonowa przekazuje sygnał na domenę cytoplazmatyczną receptora, wykazującą aktywność kinazy tyrozynowej [30, 31]. Fragment receptora o aktywności kinazy tyrozynowej jest najbardziej konserwatywną częścią receptora TrkA. Jego aktywność biologiczna inicjowana przez NGF sprowadza się do aktywności enzymatycznej kinazy tyrozynowej, przeprowadzającej reakcję fosforylacji reszt tyrozynowych. Proces ten warunkuje dalsze etapy transdukcji sygnału wywołanego związaniem NGF z jego receptorem.

III-2. Receptor p75^{NTR}

Receptor p75^{NTR} jest glikoproteiną o masie cząsteczkowej 75 kDa strukturalnie podobną do receptorów

cytokin, do których należą receptory: czynnika martwiczego nowotworu typu I i typu II (TNFR1 i TNFR2), komórkowego antygenu powierzchniowego Fas/Apo1 (lub CD95), antygenów powierzchniowych limfocytów T i B, takich jak OX40, mu4-1BB, CD40, CD24, CD30 i DR3 oraz receptor limfotoksyny β [32-34]. Jego domena zewnątrzkomórkowa zawiera powtarzające się fragmenty bogate w reszty cysteino-we. Pojedyncza domena śródbłonowa poprzedza krótką domenę cytoplazmatyczną. Ta ostatnia nie posiada aktywności kinazy tyrozynowej natomiast zawiera tzw. domenę śmierci (ang. *death domain*) uczestniczącą w indukcji zaprogramowanej śmierci komórki, czyli w procesie apoptozy [35].

Badania z wykorzystaniem jądrowego rezonansu magnetycznego (NMR) pozwoliły ustalić strukturę części receptora p75^{NTR} zawierającą domenę śmierci i nazywaną p75ICD (ang. *intracellular domain*) [36]. Różni się ona od domeny śmierci, którą zawierają receptory z rodziny TNF. Ten podtyp domeny śmierci podobny jest do domeny śmierci obecnej w rodzinie białek, do której należą jądrowy czynnik κ B (NF- κ B), kinaza DAP oraz białko myD88 [37]. Składa się ona ze 145 aminokwasów tworzących dwa prostopadłe fragmenty, zawierające po trzy helisy upakowane w globularną strukturę. Polipeptydowy segment łączący domenę śródbłonową z domeną śmierci oraz bogaty w serynę/treoninę C-końcowy fragment p75ICD cechują się bardzo dużą elastycznością. Obszar na powierzchni domeny śmierci pozbawiony jest naładowanych reszt aminokwasowych, co może wskazywać, iż jest to miejsce interakcji z substancjami przenoszącymi informację „w dół” kaskady przekazywania sygnału [36]. Badania ostatnich lat dowodzą, że pobudzenie receptora p75^{NTR} prowadzi do wzrostu aktywności sfingomielinazy i do powstania wtórnego przekaźnika — ceramidu, natomiast w aktywacji transkrypcji genów uczestniczy jądrowy czynnik κ B [38]. Wydaje się, iż śmierć komórek w wyniku apoptozy jest skorelowana ze wzrostem poziomu ceramidu i aktywacją kinazy c-Jun [39]. Mutacje w domenie śmierci receptora p75^{NTR} zdają się znosić zjawisko apoptozy [38].

IV. Zdarzenia wewnątrzkomórkowe

Większość danych dotyczących mechanizmu przekazywania sygnału przez NGF pochodzi z badań *in vitro* na komórkach linii PC12. Te komórki nowotworowe, pochodzące z rdzenia nadnerczy szczura, prowadzone w hodowli mają 48h cykl podziałów i morfologię komórek chromafinowych. Dodanie do hodowli czynników wzrostu, np. NGF powoduje różnicowanie tych komórek tak, że morfologicznie i biochemicznie przypominają one neurony współczulne. Rozrastanie się neurytów w komórkach PC12 poddanych działaniu czynników troficznych stanowi model do badania mechanizmów różnicowania komórek neuronalnych oraz roli jaką w nich odgrywają

neurotrofiny i ich receptory. Podobne badania *in vitro* przeprowadzane są także w hodowlach na liniach komórek nerwowych pobranych w okresie embrionalnym lub bardzo wczesnym postnatalnym.

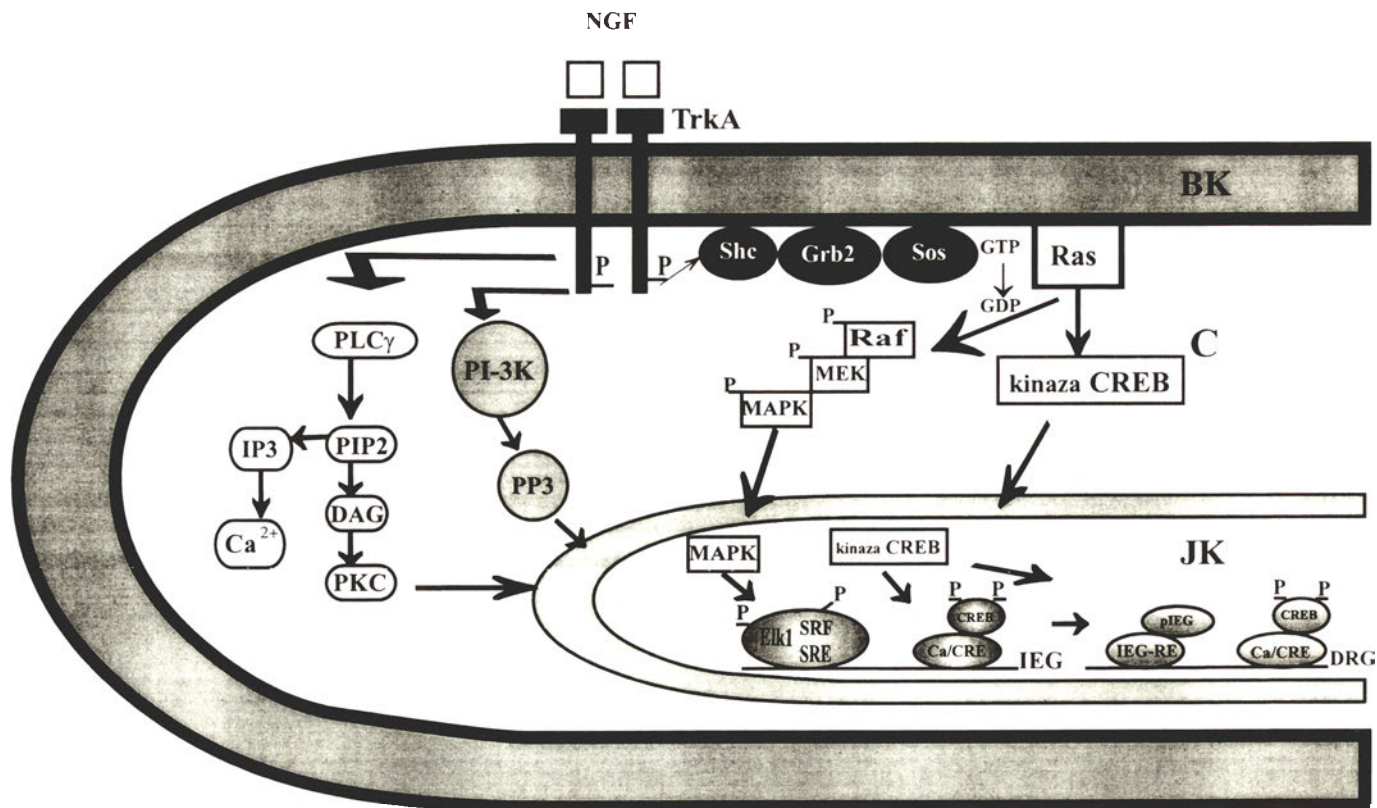
IV-1. Przekazywanie sygnału przez receptor TrkA

Pierwszym etapem transmisji sygnału troficznego jest związanie się NGF z TrkA (Ryc. 3). Związanie NGF z receptorem prowadzi do agregacji sąsiadujących receptorów, czyli oligomeryzacji [25, 27, 40]. Oligomeryzacja powoduje również wzrost powinowactwa receptora do liganda [29]. Zdarzenia te indukują zmiany konformacyjne w części zewnątrzkomórkowej receptora. Prowadzi to do pobudzenia części cytoplazmatycznej, do autofosforylacji reszt tyrozynowych i wzrostu aktywności kinazy tyrozynowej.

Związanie neurotrofiny z receptorem Trk powoduje aktywację dwóch wewnątrzkomórkowych szlaków przekazu sygnału, zależnych i niezależnych od białek Ras. Fosfotyrozyny i otaczające je reszty aminokwasowe są w cząsteczce TrkA miejscami rozpoznawanymi przez białka efektorowe, które zawierają motyw — domenę SH2 [7]. Domeny SH2, czyli domeny homologii z białkami Src, występują w różnych cząsteczkach sygnałowych. Ich łańcuch polipeptydowy zbudowany jest z około 100 reszt aminokwasowych. Podobieństwo struktury domeny SH2 do niekatalicznego regionu pp60 Src kinazy tyrozynowej [41] świadczy o jej dużym konserwatyźmie ewolucyjnym [42].

Do białek, które w wyniku interakcji z fosfotyrozynami TrkA są fosforylowane należą białka enzymatyczne, takie jak fosfolipaza C γ (PLC γ), kinaza fosfatydyloinozytolu-3 (PI-3K) oraz białko adaptorowe Shc (Ryc. 3) [7]. Każde z tych białek przekazuje sygnał w sposób dla siebie specyficzny. Aktywacja PLC γ prowadzi do powstania przekaźników drugiego rzędu — diacyloglicerolu i trifosforanu inozytolu, które aktywują kinazę białkową C oraz podwyższają wewnątrzkomórkowy poziom wapnia.

Kinaza PI-3K jest heterodimerem zbudowanym z podjednostki regulatorowej (85 kDa) zawierającej domenę SH2 oraz podjednostki katalitycznej (110 kDa). PI-3K katalizuje fosforylację pierścienia inozytolu w pozycji D-3 i bierze udział w przemianach fosfitydyloinozytolu (Ryc. 3). Stwierdzono, iż inhibitory kinazy PI-3K indukują apoptozę komórek PC12 w obecności NGF [7]. Badania dowodzą również, że aktywacja PI-3K może prowadzić do pobudzenia kinazy rybosomalnej pp70 S6 [43]. Należy zaznaczyć, że *in vivo*, w organizmie NGF wiąże się głównie z receptorami TrkA zlokalizowanymi na zakończeniach aksonalnych komórek nerwowych. Związanie NGF z receptorem zapoczątkowuje proces endocytozy kompleksów NGF-TrkA. Internalizacja kompleksu NGF-TrkA oraz jego wsteczny transport aksonalny do ciała komórki warunkują transdukcję sygnału [44, 45]. Kinaza PI-3K bierze prawdopodobnie udział we



Ryc. 3. Schemat wewnątrzkomórkowych dróg przekazywania sygnału NGF (opis w tekście). BK — błona komórkowa; C — cytoplazma; JK — jądro komórkowe; PLC γ — fosfolipaza C γ ; IP3 — inozytolo(1,4,5)trifosforan; PIP2 — fosfatydyloinozytolo(4,5)bisfosforan; DAG — diacylglicerol; PKC — kinaza białkowa C; PI-3K — 3-kinaza fosfatydyloinozytoli; PP3 — fosfatydyloinozytolo(3,4,5),trifosforan; Shc — białko adaptorowe; Grb 2 — białko związane z receptorem czynnika wzrostu; Sos — białkowy czynnik wymieniający nukleotydy guaninowe; GTP — guanozynotrifosforan; GDP — guanozynodifosforan; Ras — rodzina białek onkogennych; Raf — kinaza serynowo/treoninowa; MEK — kinaza kinazy MAP-Erk; MAPK — kinaza białkowa aktywowana przez mitogeny; CREB (ang. *cAMP responsive element-binding protein kinase*) — czynnik transkrypcyjny odpowiedzialny za indukcję genów zależnych od cyklicznego AMP, aktywowany na drodze fosforylacji przez kinazę białkową A; CRE (ang. *cAMP responsive element*) — regulatorowe sekwencje DNA wiążące czynniki transkrypcyjne (np. CREB), aktywowane na drodze fosforylacji przez fosfokinazę A i warunkujące odpowiedź na cAMP; SRF (ang. *serum responsive factor*) — czynnik transkrypcyjny; SRE (ang. *serum responsive element*) — regulatorowe sekwencje DNA wiążące czynniki transkrypcyjne; Elk1 — czynnik transkrypcyjny; IEG (ang. *immediate early genes*) — geny wczesnej odpowiedzi komórkowej; IEG-RE (ang. *immediate early genes responsive element*) — sekwencje regulatorowe genów wczesnej odpowiedzi komórkowej; DRG (ang. *delayed response genes*) — geny późnej odpowiedzi komórkowej; pIEG (ang. *protein products of IEG*) — białkowe produkty genów wczesnej odpowiedzi komórkowej.

wstecznym transporcie aksonalnym, uczestnicząc w internalizacji kompleksu NGF-TrkA [43, 46].

Białko Shc i Ras uczestniczą w aktywacji transdukcji sygnału z udziałem serynowo/treoninowej kinazy Raf i kinaz MAP (ang. *mitogen activated protein kinases*) (Ryc. 3). Uaktywnienie drogi sygnału Ras-MAP następuje w chwili związania się białka adaptorowego Shc z uaktywnionym (ufosforylowanym) receptorem TrkA. Białko Shc nie ma własności katalitycznych. Wiąże się ono z resztą tyrozynową (Tyr 490) receptora zlokalizowaną w regionie przybłonowym (ang. *juxtamembrane region*) [47] i staje się substratem receptorowej kinazy tyrozynowej. Ufosforylowane Shc wiąże się wówczas z białkiem Grb2 zawierającym domeny SH2 i SH3. Uczestniczą one w interakcji białka Grb2 z białkiem Sos (czynnik wymieniający nukleotydy guaninowe) [7]. Białko Sos z kolei uaktywnia związane z wewnętrzną powierzchnią błony plazmatycznej białko Ras. W następstwie jego uaktywnienia dochodzi do pobudzenia serynowo/treoninowej kinazy Raf [48]. Uaktywniona Raf fosforyluje i stymuluje kinazę MEK1. Jej fosforylacja, katalizowana przez Raf

zachodzi w dwóch miejscach: Ser 217 i Ser 221. Substratami MEK1 są kinazy MAP1 i MAP2. Ufosforylowane kinazy MAP nie działają wyłącznie w pobliżu błony komórkowej, ale ulegają przemieszczeniu do jądra komórkowego. Wśród substratów kinaz MAP jest kilka czynników transkrypcyjnych oraz kinazy rybosomalne S6 (pp90srks) [49].

Zasadniczą konsekwencją transdukcji sygnału z udziałem kinaz MAP jest regulacja ekspresji genów (Ryc. 3), w wyniku czego dochodzi do aktywacji komórek neuronalnych i ich różnicowania [49]. Kinazy MAP wpływają na transkrypcję protoonkogenu *c-fos*. Udało się zidentyfikować kilka kluczowych fragmentów promotora *c-fos*, które pośredniczą w transdukcji sygnału NGF, na przykład złożony z 20 par zasad fragment SRE (ang. *serum responsive element*) zlokalizowany w pobliżu miejsca inicjacji syntezy mRNA-*Fos*. Rdzeń SRE tworzy fragment CArG zbudowany z sekwencji CC(A/T)₆GG. Wiąże on czynnik transkrypcyjny SRF (ang. *serum responsive factor*) [50, 51]. SRF jest stymulatorem transkrypcji *c-fos*. W aktywacji *c-fos* ważną rolę odgrywa również sek-

wencja CAGGAT przylegająca do fragmentu DArG. Jest ona miejscem wiązania czynnika transkrypcyjnego Elk1 [52]. Elk1 należy do rodziny czynników transkrypcyjnych, do której zalicza się takie czynniki, jak Sap1a, Sap1b, Net [53]. Każdy z tych czynników może tworzyć trzyczęściowy kompleks z SRF i SRE. Badania na komórkach PC12 udowodniły, że SRF i Elk1 pośredniczą w zależności od SRE transkrypcji *c-fos* indukowanej przez NGF [54].

Oprócz kompleksu potrójnego w regulacji transkrypcji indukowanej przez NGF biorą udział również inne czynniki. Z promotorem *c-fos* może także wiązać się czynnik transkrypcyjny CREB (ang. *cAMP regulatory element-binding protein*) [47, 55]. Drogą przez białko Ras aktywowana jest kinaza CREB, która przemieszcza się do jądra komórkowego i fosforyluje czynnik CREB na stałe związany z DNA (Ryc. 3). W wyniku tego CREB wiąże się z sekwencją regulatorem cAMP-Ca (Ca-CRE) i aktywuje geny wczesnej odpowiedzi komórkowej (IEG, ang. *immediate early genes*). Wiele z białek, będących produktami genów IEG jest również czynnikami transkrypcyjnymi (pIEG), które z kolei wiążą się z sekwencjami regulatorem IEG-RE (ang. *immediate early genes responsive elements*), obecnymi w obszarach regulacji transkrypcji genów później odpowiedzi komórkowej DRG (ang. *delayed response genes*). Uważa się, że białka pIEG aktywują transkrypcję genów DRG wspólnie z czynnikiem CREB, wiążącym się z obszarem promotorowym genów DRG [44].

NGF jest białkiem, które po związaniu ze swoistym receptorem powoduje indukcję wielu różnych czynników transkrypcyjnych. Należy do nich czynnik transkrypcyjny AP-1 (ang. *activator protein-1*) i AP-2 α [56] oraz produkty genów wczesnej odpowiedzi komórkowej indukowanych przez NGF (NGFI, ang. *nerve growth factor inducible genes*), takie jak NGFI-A (tożsamy z czynnikiem transkrypcyjnym Zif-268), NGFI-B i NGFI-C [57], a także produkt genu VGF [58]. Indukowane przez NGF czynniki transkrypcyjne biorą udział w regulacji ekspresji genów kodujących białka związane z procesami neurotransmisji i neuromodulacji, na przykład acetylotransferazy cholinowej, neuropeptydu Y i substancji P, a także w regulacji ekspresji genu kodującego sam NGF [59]. Gen dla NGF zawiera sekwencję rozpoznawaną przez czynnik AP-1, położoną w miejscu połączenia egzonu 1 i intronu 1, 35 par zasad „w dół” od miejsca inicjacji transkrypcji [60]. W komórce czynnik AP-1 może być indukowany przez bardzo wiele bodźców. Jednym z nich jest także sygnał powstały w wyniku związania NGF z receptorami TrkA. Wiadomo, że poziom syntezy NGF w fibroblastach zależy od obecności funkcjonalnego czynnika AP-1 [61]. AP-1 jest heterodimerem utworzonym przez białka c-Fos i JunB, także produkty genów wczesnej odpowiedzi komórkowej, aktywowanym przez kinazy białkowe A (PKA) i C (PKC). Udowodniono, że wzrost ekspresji genu

NGF obserwowany po uszkodzeniach układu nerwowego zależy od aktywności białka c-Fos [62]. Również wzrost poziomu NGF wywołany stymulacją receptorów β -adrenergicznych związany jest z aktywacją genu *c-fos* [63].

Dotąd przyjmowano, że w komórkach neuronalnych funkcjonują przynajmniej trzy wzajemnie niezależne drogi przekazywania sygnału w odpowiedzi na NGF: droga z udziałem PLC γ , droga z udziałem PI-3K oraz droga związana z białkiem Ras. Przypuszcza się, że drogą z udziałem kinazy PI-3K przekazywany jest sygnał, który wpływa na regulację przeżywalności komórek nerwowych [64]. W procesy te zaangażowana jest serynowo/treoninowa kinaza Akt, która zarówno *in vitro*, jak i *in vivo* aktywowana jest przez fosfatydyloinozitol. powstający w wyniku aktywności PI-3K. Zatem kinaza Akt byłaby kolejnym ogniwem tej drogi odpowiedzi na NGF. Udowodniono, że aktywność kinazy Akt jest konieczna do przeżycia neuronów mózdzku u szczura w okresie rozwoju [65, 66]. Natomiast przekazywanie sygnału drogą Ras-MAP ma znaczenie przede wszystkim w regulacji procesów różnicowania komórek i neurytogenezie. Wykazano jednak, że w komórkach PC12 aktywność kinazy PI-3K jest kontrolowana przez fragment receptora TrkA wiążący Shc i wpływa nie tylko na przeżywalność, ale także na inicjowanie neurytogenezy [67, 68]. Być może istnieje wzajemne oddziaływanie pomiędzy drogami przekazywania sygnału wywołanego NGF, jednak nie znamy dotąd wszystkich łączących je ogniw.

IV-2. Przekazywanie sygnału przez receptor p75^{NTR}

Pobudzenie receptorów p75^{NTR} może wywoływać efekty troficzne, takie jak pobudzenie migracji i różnicowania neuronów, ale może również prowadzić, podobnie jak stymulacja innych receptorów z tej rodziny, do hydrolizy sfingolipidów, produkcji ceramidu i w konsekwencji do programowanej śmierci komórek, czyli apoptozy. Jakkolwiek związek pomiędzy aktywnością receptorów p75^{NTR} i programowaną śmiercią komórki został udowodniony, to nadal istnieją rozbieżne opinie na temat tego, czy proces ten indukowany jest w sposób zależny, czy też niezależny od NGF [39, 69]. Mechanizm przekazywania obu rodzajów sygnałów przez p75^{NTR} nie jest tak dobrze poznany, jak w przypadku receptorów TrkA, które w ostatnich latach głównie przyciągały uwagę badaczy.

Wiadomo, że u szczura pobudzenie receptora p75^{NTR} przez NGF w komórkach Schwanna (rodzaj komórek glejowych wytwarzających osłonkę mielinową neuronów obwodowych) prowadzi do aktywacji czynnika transkrypcyjnego NF- κ B [38], natomiast w komórkach oligodendrocytów (rodzaj komórek glejowych obecnych w mózgu) [39] i w komórkach zwojowych siatkówki [69] powoduje wzrost poziomu

ceramidu, aktywację kinaz JNK (ang. *Jun N-terminal kinases*) i w konsekwencji śmierć komórek w procesie apoptozy. Należy przy tym podkreślić, że w komórkach tych nie odnotowano ekspresji receptorów TrkA.

Wykazano, że w komórkach Schwanna oraz w transformowanych fibroblastach, przejawiających ekspresję receptora p75^{NTR}, podawanie NGF powoduje translokację czynnika NF-κB do jądra komórkowego. NF-κB jest dimerem zbudowanym z białkowych podjednostek p65 i p50 [38]. W niepobudzonych komórkach czynnik ten obecny jest w cytoplazmie w formie nieaktywnej, co zapewnia związany z nim specyficzny inhibitor IκB. Inhibitor IκB maskując fragment zawierający sygnał lokalizacji jądrowej uniemożliwia przemieszczanie się NF-κB do jądra. Związanie się białek z rodziny TNF ze swoistymi dla nich receptorami powoduje aktywację kinazy białkowej (sądzi się, że jest to PKCγ), która fosforyluje i degraduje inhibitor IκB. Umożliwia to przemieszczenie się NF-κB do jądra komórkowego, gdzie aktywuje on transkrypcję określonych genów. Uważa się, że receptor p75^{NTR} spokrewniony z rodziną białek TNF mógłby działać w podobny sposób [70]. Jednym z możliwych genów docelowych dla NF-κB mógłby być gen kodujący białko adhezji komórkowej L1. Podawanie NGF w stężeniach nanomolarnych powodowało wzrost poziomu białka L1 w komórkach PC12 oraz w komórkach Schwanna [71]. Zwiększony poziom L1 mógłby być odpowiedzialny za szybszą migrację komórek Schwanna obserwowaną wówczas, gdy komórki te poddano działaniu NGF. Efekt ten był blokowany przez przeciwciała skierowane przeciw receptorowi p75^{NTR} [72]. Wiele danych wskazuje na to, że przenoszenie efektów troficznych przez receptor p75^{NTR} odbywa się drogą z udziałem czynnika transkrypcyjnego NF-κB.

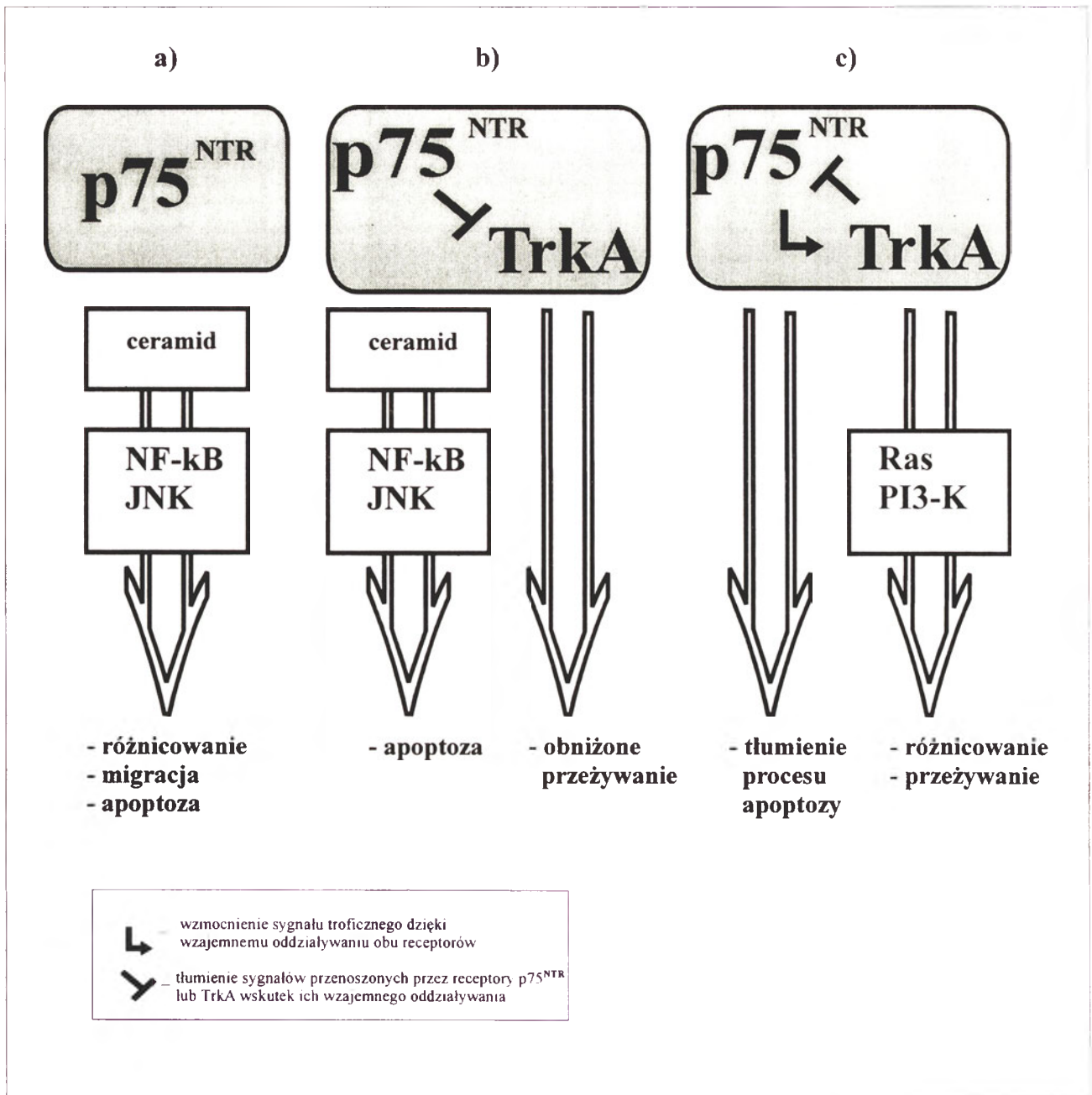
Receptor p75^{NTR} ma jednak dwojaką naturę i w pewnych okolicznościach stymuluje syntezę ceramidu oraz indukuje apoptozę. Nie wiadomo w jaki sposób receptor p75^{NTR} raz działa jako czynnik neuroprotekcyny, a innym razem jako czynnik promujący apoptozę. O pewnych mechanizmach jego działania możemy domniemywać na podstawie podobieństwa p75^{NTR} do receptorów z rodziny TNFR. Receptory z tej rodziny charakteryzują się tym, że ich wewnątrzkomórkowe domeny mogą oddziaływać ze specyficznymi białkami cytozolowymi, nazywanymi interaktorami receptora (ang. *receptor interactors*) [33]. Białka te mają zdolność przenoszenia sygnału śmierci z domeny wewnątrzkomórkowej na kolejne ogniwa kaskady zdarzeń molekularnych prowadzonych do apoptozy. Zakłada się, że również receptor p75^{NTR} posiada specyficzne dla siebie białko interaktorowe. Ostatnio zidentyfikowano białko [73] nazwane NFIR (ang. *neurotrophin receptor interacting factor*) i wykazano, że ma ono zdolność do interakcji z domeną p75^{NTR} receptora w sposób zależny od liganda, tj. NGF. Być może jest ono ogniwem w przenoszeniu sygnału do apop-

tozy, jednak nie wykazano tego eksperymentalnie.

V. Receptor p75^{NTR} moduluje funkcję troficzną receptora TrkA

Wiele badań potwierdza, że receptor p75^{NTR} moduluje aktywność receptora TrkA [67]. Używając specyficznych przeciwciał monoklonalnych jako ligandów, pozwalających odróżnić p75^{NTR} od TrkA stwierdzono, iż nie związany p75^{NTR} może modyfikować aktywność receptora TrkA [74]. W komórkach, które przejawiały ekspresję TrkA, ale nie miały ekspresji p75^{NTR}, związane liganda przez TrkA prowadziło do znaczącej troficznej odpowiedzi na sygnał. W komórkach, w których ekspresji ulegały zarówno receptory TrkA, jak i p75^{NTR}, ale tylko TrkA były związane z przeciwciałem, obserwowano znaczący, lecz suboptymalny sygnał. Optymalną odpowiedź troficzną uzyskano w sytuacji związania zarówno TrkA, jak i p75^{NTR} z przeciwciałami. W takiej kombinacji wzrosły również efekty troficzne NGF podawanego w stężeniach suboptymalnych równocześnie z przeciwciałami. Zaobserwowano także, iż komórki z ekspresją tylko p75^{NTR} wykazywały bardzo ograniczony efekt troficzny lub jego brak. Również inne badania *in vitro* dowodzą, że wiązanie NGF następuje w wyniku interakcji między receptorami o niskim i wysokim powinowactwie. Wykazano, że przeniesienie odpowiedzi troficznej wymaga asocjacji obu typów receptorów przy czym asocjacja ta zależy od zewnątrz- i wewnątrzkomórkowych domen obu receptorów [75]. Ponadto, NGF podlega endocytozie tylko w tych komórkach, które cechuje ekspresja TrkA, ale nie w tych, w których obecny jest jedynie receptor p75^{NTR}. Jednak w komórkach wykazujących ekspresję obu receptorów proces endocytozy NGF regulowany jest także przez wewnątrzkomórkową domenę receptora p75^{NTR}.

Jaki zatem jest udział i wzajemne oddziaływanie receptorów obu typów w procesach regulowanych przez NGF? Uważa się, że rodzaj odpowiedzi aktywowanej przez oba receptory zależy od poziomu ich ekspresji w komórce neuronalnej i że, w zależności od sytuacji, mogą one antagonizować lub wspomagać swoje wzajemne oddziaływanie (Ryc. 4) [8]. Wysoki poziom aktywacji receptora p75^{NTR} pod nieobecność receptorów TrkA prowadzi do: zwiększonej migracji komórek, indukcji procesów różnicowania lub też do apoptozy (Ryc. 4a) [39, 69, 71, 76-78]. Jeżeli poziom ekspresji receptora p75^{NTR} jest wysoki, a receptor TrkA ulega ekspresji na poziomie suboptymalnym, to efektem tego jest indukcja apoptozy i tłumienie troficznego sygnału TrkA przez receptor p75^{NTR}. W wyniku tego obniża się przeżywalność komórek neuronalnych (Ryc. 4b). Z kolei przy wysokim poziomie ekspresji receptorów TrkA przenoszony przez nie sygnał troficzny ulega wzmocnieniu dzięki współdziałaniu z receptorem p75^{NTR}. Ponadto wysoka aktywność receptorów TrkA hamuje syntezę ceramidu i blokuje sygnał uru-



Ryc. 4. Informacja niesiona przez NGF jest przekazywana do komórki przez receptory dwu rodzajów: p75^{NTR} oraz TrkA. Schemat przedstawia możliwe oddziaływania między receptorami oraz skutki fizjologiczne ich interakcji (opis w tekście; NF-kB — jądrowy czynnik transkrypcyjny kappa B; PI-3K — 3-kinaza fosfatydyloinozytolu; Ras — rodzina białek onkogennych; JNK (ang. *Jun N-terminal kinases*) — N-końcowe kinazy Jun.

chamiający proces apoptozy przekazywany przez receptor p75^{NTR} (Ryc. 4c) [8, 79].

VI. Podsumowanie

Odkryty ponad 40 lat temu czynnik wzrostu nerwów jest jednym z najintensywniej badanych czynników wzrostowych. W okresie rozwoju organizmu wpływa on na proliferację, różnicowanie i przeżywalność komórek nerwowych. Ma także istotne znaczenie w ich prawidłowym funkcjonowaniu w dojrzałym organizmie. Transdukcja sygnału niesionego przez NGF obejmuje procesy związane z błoną komórkową, z wstecznym i postępującym transportem aksonalnym, wreszcie z aktywacją czynników transkrypcyjnych

i regulacją ekspresji genów. W ostatnich latach znaczącym przełomem w badaniach nad przekazywaniem sygnału przez neurotrofiny było opisanie roli, jaką w tych procesach odgrywa receptor p75^{NTR}. Okazało się, że p75^{NTR} nie jest tylko pomocniczym receptorem wspomagającym aktywność receptorów TrkA, ale może niezależnie pełnić szereg istotnych funkcji. Najbardziej frapującą z nich jest jego udział w indukowaniu programowanej śmierci komórek neuronalnych, zarówno w czasie naturalnego ich wymierania w rozwijającym się układzie nerwowym, jak i po uszkodzeniach układu nerwowego. Najważniejsze obecnie pytanie dotyczy mechanizmów przekazywania sygnału do apoptozy oraz tego w jaki sposób receptor p75^{NTR}, z jednej strony gra rolę wzmacniającą efekty troficzne

przenoszone przez receptor TrkA, z drugiej natomiast jest białkiem indukującym śmierć komórek. Kolejnym problemem jest wyjaśnienie mechanizmów wzajemnego oddziaływania receptorów obu typów. Wyniki badań na poziomie fizjologicznym wskazują, że w komórkach neuronalnych występuje różnorodne wzajemne oddziaływanie obu receptorów. Znaczny postęp dokonał się także w wyjaśnieniu mechanizmów przekazywania sygnałów troficznych przez receptory TrkA, wliczając w to odkrycia z ostatnich lat, czyli zidentyfikowanie dróg z udziałem białka Ras i kinazy PI-3K oraz Akt. W odniesieniu do tego powstają kolejne pytania, np. czy opisane drogi przekazywania sygnału są od siebie niezależne, czy też oddziałują na siebie wzajemnie. Jeżeli tak, to które z komórkowych zdarzeń molekularnych są łączącymi je ogniwami. Ponadto, wciąż jeszcze nie wiemy, czy wszystkie komórki nerwowe wykorzystują te same drogi transdukcji sygnałów troficznych niesionych przez neurotrofiny.

Badania zmierzające do zrozumienia mechanizmu przekazywania sygnału przez NGF i pozostałe neurotrofiny mają znaczenie dla ewentualnego wykorzystania czynników neurotroficznych w postępowaniu klinicznym. Potencjalne możliwości zastosowania neurotrofin jako substancji terapeutycznych w regeneracji uszkodzonego układu nerwowego, w chorobach neurodegeneracyjnych (np. w chorobie Alzheimera), a także w chorobach nowotworowych stanowią bardzo istotny bodziec do badań nad mechanizmami ich działania.

Podziękowanie

Praca finansowana z projektu badawczego nr 4 PO5A 014 15 Komitetu Badań Naukowych

Artykuł otrzymano 25 maja 1998 r.
Zaakceptowano do druku 16 listopada 1998 r.

Piśmiennictwo

- Loughlin SE, Fallon JH (1993) Neurotrophic factors. Academic Press Inc., San Diego
- Niewiadomska G, Malecki M (1998) *Kosmos* 47: 11-21
- Vantini G, Skaper SD (1992) *Pharmacological Res* 26: 1-15
- Sofroniew MV, Cooper JD (1993) *Semin Neurosci* 5: 285-294
- Levi-Montalcini R, Skaper SD, Dal Taso R, Petrelli L, Leon A (1996) *Trends Biochem Sci* 19: 514-519
- Bothwell M (1995) *Annu Rev Neurosci* 18: 223-253
- Segal RA, Greenberg ME (1996) *Ann Rev Neurosci* 19: 463-489
- Kaplan DR, Miller FD (1997) *Curr Opin Cell Biol* 9: 213-221
- Varon S, Nomura J, Shooter EM (1967) *Biochemistry* 6: 2202-2209
- Bradshaw RA (1978) *Annu Rev Biochem* 47: 191-216
- Bradshaw RR, Murray-Rust J, Ibanez CF, McDonald NQ, Lapatto R, Blundell TL (1994) *Protein Science* 3: 1901-1913
- McDonald NQ, Lapatto R, Murray-Rust J, Gunning J, Wlodawer A, Blundell TL (1991) *Nature* (Lond) 354: 411-414
- Ilag LL, Lonnerberg P, Persson H, Ibanez CF (1994) *J Biol Chem* 269: 19941-19946
- Ibanez CF (1994) *J Neurobiol* 25: 1349-1361
- Ibanez CF, Hallbook F, Ebendal T, Persson H (1990) *EMBO J* 9: 1477-1483
- Ibanez CF, Ebendal T, Barbany G, Murray-Rust J, Blundell TL, Persson H (1992) *Cell* 9: 329-341
- Longo FM, Vu TKH, Mobley WC (1990) *Cell Regulation* 1: 189-195
- Ibanez CF, Ilag LL, Murray-Rust J, Persson H (1993) *EMBO J* 12: 2281-2293
- Kullander K, Kaplan D, Ebendal T (1997) *J Biol Chem* 272: 9300-9307
- Guo M, Meyer SL, Kaur H, Gao JJ, Neet KE (1996) *Protein Science* 5: 447-455
- Woo SB, Timm DE, Neet KE (1995) *J Biol Chem* 270: 6278-6285
- Shih A, Laramee GR, Schmelzer CH, Burton LE, Winslow JW (1994) *J Biol Chem* 269: 27679-27686
- Nanduri J, Vroegop SM, Buxser SE, Neet KE (1994) *J Neurosci Res* 37: 433-444
- Skup M (1997) *Neur Neurochir Pol* 31, Supl 1: 29-46
- Skup M (1997) W: Nowak JZ, Zawilska JB (red.) Receptory, struktura, charakterystyka, funkcja. Wydawnictwo naukowe PWN, Warszawa, str. 274-292
- Meakin SO, Shooter EM (1992) *Trends Neurosci* 15: 323-326
- Ullrich A, Schlessinger J (1990) *Cell* 61: 203-212
- Urfer R, Tsoulfas P, O'Conel L, Shelton DL (1995) *EMBO J* 14: 2795-2801 Barbacid M (1995) *Ann NY Acad Sci* 766: 442-458
- Holden PH, Asopa V, Robertson AG, Clarke AR, Tyler S, Bennett GS, Brain SD, Wilcock GK, Allen SJ, Smith SK, Dawbarn D (1997) *Nat Biotechnol* 15: 668-672
- Barbacid M (1995) *Curr Opin Cell Biol* 7: 148-155
- Schuit FC (1994) *Inleiding moleculaire biologie*. Bohn Stafleu Van Loghum, Houten/Zaventem, str. 177-179
- Ebadi M, Bashir RM, Heidrick ML, Hamada FM, Refaey H, Hamed A, Helal G, Baxi MD, Cerutis DR, Lassi NK (1997) *Neurochem Int* 30: 347-374
- Carter BD, Lewin GR (1997) *Neuron* 18: 187-190
- Dechant G, Barde Y-A (1997) *Curr Opin Neurobiol* 7: 413-418
- Rabizadeh S, Oh J, Zhong L, Yang J, Bitter CM, Butcher LL, Bredesen DE (1993) *Science* 261: 345-348
- Liepinsh E, Ilag LL, Otting G, Ibanez CF (1997) *EMBO* 16: 4999-5005
- Feinstein E, Kimchi A, Wallach D, Boldin M, Varfolomeev E (1995) *Trends Biochem Sci* 20: 342-344
- Carter BD, Kaltschmidt C, Kaltschmidt B, Offenhauser N, Bohm-Matthaci R, Baeuerle PA, Barde Y-A (1996) *Science* 272: 542-545
- Casaccia-Bonnet P, Carter B, Dobrowsky RT, Chao MV (1996) *Nature* (Lond) 383: 716-719
- Treanor JJ, Schmelzer C, Knusel B, Winslow JW, Shelton DL, Hefti F, Nikolic K, Burton LE (1995) *J Biol Chem* 270: 23104-23110
- Cohen G, Ren R, Baltimore D (1995) *Cell* 80: 237-248
- Evpel T, Courtneidge SA (1995) *Curr Opin Cell Biol* 7: 176-182
- Chung J, Grammer T, Lemon K, Kazlauskas A, Blenis J (1994) *Nature* (Lond) 370: 71-75
- Riccio A, Pierchala BA, Ciarallo CL, Ginty DD (1997) *Science* 277: 1097-1100
- Senger DL, Campenot R (1997) *J Cell Biol* 138: 411-421
- Kundra V, Escobedo J, Kazlauskas A, Kim H, Rhee S (1994) *Nature* (Lond) 367: 474-476
- Xing J, Ginty DD, Greenberg ME (1996) *Science* 273: 959-963
- Wood KW, Sarnecki C, Roberts TM, Blenis J (1992) *Cell* 68: 1041-1050
- Hill C, Treisman R (1995) *Cell* 80: 199-211
- Treisman R (1992) *Trends Biochem Sci* 17: 423-426
- Treisman R (1994) *Curr Opin Genet Dev* 4: 694-701
- Treisman R, Marais R, Wynne J (1992) *EMBO J* 11: 4631-4640

53. Giovane A, Pintzas A, Maira S, Sobieszczuk P, Wasyluk B (1994) *Genes Dev* **8**: 1502-1513
54. Miranti C, Ginty D, Huancay G, Chatila T, Greenberg ME (1995) *Mol Cell Biol* **15**: 3672-3684
55. Berkowitz L, Riabowal K, Gilman M (1989) *Mol Cell Biol* **9**: 4272-4281
56. Morgan JI, Curran T (1989) *Trends Biochem Sci* **12**: 459-462
57. Milbrandt J (1987) *Science* **238**: 797-799
58. Salton SR, Fischberg DJ, Dong K W (1991) *Mol Cell Biol* **11**: 2335-2349
59. Colangelo AM, Pani L, Mochetti J (1996) *Mol Brain Res* **35**: 1-10
60. Zheng M, Heinrich G (1988) *Mol Brain Res* **3**: 133-140
61. D'Mello SR, Heinrich G (1991) *Mol Brain Res* **11**: 255-264
62. Henger B, Lindholm D, Heuman R, Ruther U, Wagner EF, Thoenen H (1990) *Proc Natl Acad Sci USA* **87**: 3899-3903
63. Mochetti I, Bernardi MA, Szekely AM, Alho H, Brooker G, Costa E (1989) *Proc Natl Acad Sci USA* **86**: 3891-3895
64. Yao R, Cooper G (1995) *Science* **267**: 2003-2006
65. Franke TF, Kaplan DK, Cautley LC, Tocker A (1997) *Science* **275**: 665-668
66. Dudek H, Datta SD, Franke TF, Birnbaum MJ, Cooper GM, Segal RA, Kaplan DK, Greenberg ME (1997) *Science* **275**: 661-665
67. Greene LA, Kaplan DR (1995) *Curr Opin Neurobiol* **5**: 579-587
68. Baxter RM, Cohen P, Obermeier A, Ulrich A, Downes CP, Doza YN (1995) *Eur J Biochem* **234**: 84-91
69. Frade JM, Rodriguez-Tebar A, Brade Y-A (1996) *Nature (Lond)* **383**: 166-168
70. Carter BD, Dechant G, Frade JM, Kaltschmidt C, Barde Y-A (1996) *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **61**: 407-415
71. Itoh K, Brackenburg R, Akesson RA (1995) *J Neurosci* **15**: 2504-2512
72. Anton ES, Weskamp G, Reichardt LF, Matthew WD (1994) *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 2795-2799
73. Carter BD, Kaltschmidt C, Dechant G, Casademunt E, Chao MV, Barde Y-A (1996) *Soc Neurosci Abstr* **22**: 1213
74. Maliartchouk S, Saragovi HU (1997) *J Neurosci* **17**: 3031-3037
75. Gargano N, Levi A, Alema S (1997) *J Neurosci Res* **50**: 1-12
76. Von Bartheld CS, Kiroshita Y, Prevetie D, Yin QW, Oppenheim RW, Bothwell M (1994) *Neuron* **12**: 639-654
77. Van der Zee CEM, Ross GM, Riopelle RJ, Hagg T (1996) *Science* **274**: 1729-1732
78. Blochl A, Sirrenberg C (1996) *J Biol Chem* **271**: 21100-21107
79. Holgado-Madruga M, Moscatello DK, Emler DR, Dietrich R, Wong AJ (1997) *Proc Natl Acad Sci USA* **94**: 12419-12424

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

Gdańsk (Poland)
14—18 September, 1999

Organized for ESSPPMM

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

Chairman of the Organizing Committee: Prof. Dr Wiesław Makarewicz

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

Information and inquiries:
PP'99
Dr. A.C. Składanowski
Department of Biochemistry
Medical University of Gdańsk
ul. Dębinki 1, 80-211 Gdańsk, Poland
Tel fax: (+48 58) 3021386
e-mail: pp99@amedec.amg.gda.pl.

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

Proteoliza wewnątrzkomórkowa

Intracellular proteolysis

MAGDALENA STASZCZAK¹,
EDYTA ZDUNEK²

Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Lizosomalna degradacja białek
 - II-1. Szlaki proteolizy lizosomalnej
 - II-2. Mechanizm proteolizy lizosomalnej
- III. Wakuolarna degradacja białek
- IV. Proteoliza endosomalna
- V. Proteoliza zależna od ATP u *Prokaryota*
 - V-1. Proteaza Lon
 - V-2. Proteaza Clp
 - V-3. Proteaza FtsH
- VI. Pozalizosomalna proteoliza zależna od ATP u *Eukaryota*
 - VI-1. ATP-zależna proteoliza w mitochondriach
 - VI-2. ATP-zależna proteoliza w chloroplastach
 - VI-3. Proteoliza z udziałem 26S proteasomu
- VII. Proteoliza z udziałem kalpain
- VIII. Proteoliza w retikulum endoplazmatycznym
- IX. Proteoliza w aparacie Golgiego
- X. Uwagi końcowe

Contents:

- I. Introduction
- II. Lysosomal degradation of proteins
 - II-1. Pathways of lysosomal proteolysis
 - II-2. Mechanism of lysosomal proteolysis
- III. Vacuolar degradation of proteins
- IV. Proteolysis in endosomes
- V. ATP-dependent proteolysis in *Prokaryota*
 - V-1. Lon protease
 - V-2. Clp protease
 - V-3. FtsH protease
- VI. Nonlysosomal ATP-dependent proteolysis in *Eukaryota*
 - VI-1. ATP-dependent proteolysis in mitochondria
 - VI-2. ATP-dependent proteolysis in chloroplasts
 - VI-3. Protein degradation by the 26S proteasome
- VII. Nonlysosomal proteolysis by the calpains
- VIII. Proteolysis in the endoplasmic reticulum
- IX. Proteolysis in the Golgi apparatus
- X. Final remarks

Wykaz stosowanych skrótów: AAA — ATP-azy związane z różnymi aktywnościami komórkowymi; ACE — enzym przekształcający angiotensynę; CAD — białka zawierające konserwatywną domenę ATP-azową; CANP — neutralne proteazy aktywowane przez Ca^{2+} ; Clp — proteaza połączona z białkiem opiekuńczym; E-64 — L-trans-epoksybursztynylo-leucyloamido(-3-metylo)butan; ERAD — degradacja białek związana z endoplazmatycznym retikulum; hsc 73 — konstytutywne białko szoku termicznego o m. cząst. 73 kDa; KFERQ — sekwencja Lys-Phe-Glu-Arg-Gln; PEST — region peptydowy bogaty w prolinę (P), kwas glutaminowy (E), serynę (S), treoninę (T); t-CANP — tkankowo-specyficzne neutralne proteazy aktywowane przez Ca^{2+} ; u-CANP — powszechnie występujące neutralne proteazy aktywowane przez Ca^{2+}

I. Wstęp

Proteoliza odgrywa ważną rolę zarówno w procesach katabolicznych jak też regulatorowych — jej wynikiem może być całkowita hydroliza łańcuchów polipeptydowych lub jedynie usunięcie niektórych sekwencji aminokwasowych. Całkowita hydroliza warunkuje, poza degradacją białek egzogennych, tak

ważne funkcje komórek, jak: modulowanie wielkości puli kluczowych enzymów i białek regulatorowych, usuwanie białek nieprawidłowych, a także rozkład zbędnych białek komórkowych — szczególnie istotny w warunkach głodu lub różnicowania. Natomiast ograniczonej proteolizie przypisywany jest udział w procesie dojrzewania białek obejmującym: (a) usunięcie metioniny lub N-formylometioniny z nowo syntetyzowanych łańcuchów polipeptydowych, (b) przekształcanie pre- lub preprobiałek związane z usuwaniem peptydu sygnałowego warunkującego transport przez błony [1, 2], (c) przekształcanie w aparacie Golgiego nieaktywnych probiałek, np. prekursorów białek lizosomalnych i sekrecyjnych, w formy biologicznie aktywne [3, 4], (d) uwalnianie przez sekretazy (*secretases*, *membrane protein convertases*, *shedases*) rozpuszczalnych izoform białek błonowych [5]. Przekształcanie pre- i preprobiałek katalizują peptydazy sygnałowe stanowiące nowy typ proteinaz serynowych (nie wymagających His) [2], które znajdują się w błonach retikulum endoplazmatycznego, w matriks i błonie wewnętrznej mitochondriów, w stromie i błonie tylakoidów. Natomiast większość sekretaz to metaloproteazy katalizujące cięcie białek błonowych w rejonie bliskim zewnątrzkomórkowej powierzchni błony, które powoduje uwolnienie fizjologicznie aktywnych białek np. enzymu przekształcającego angiotensynę ACE (*angiotensin converting enzyme*), receptorów, li-

¹Dr, ²mgr. Zakład Biochemii Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, Plac M. Curie-Skłodowskiej 3, 20-031 Lublin e-mail: magda@hermes.umcs.lublin.pl
Katedra Biochemii, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego, ul. Rakowiecka 26/30, 02-528 Warszawa

gandów receptorów [5]. Ograniczona proteoliza stanowi również podstawę działania kalpain¹, w wyniku którego dochodzi m.in. do zmiany aktywności (aktywacji/inaktywacji) lub zmiany mechanizmu regulacji aktywności danego białka [6].

Procesy degradacyjne poszczególnych białek przebiegają z różną szybkością [7-9]. Przyczyny różnic w okresie półtrwania białek wewnątrzkomórkowych nie są w pełni wyjaśnione. W latach 70-tych próbowano ustalić korelację pomiędzy szybkością degradacji a ogólnymi własnościami fizykochemicznymi białka substratowego [7, 8], takimi jak ciężar cząsteczkowy, punkt izoelektryczny czy ilość powierzchniowych obszarów hydrofobowych. Za sygnały wyznaczające białka do degradacji uważano modyfikacje cząsteczek białkowych, takie jak np. glikozylacja, fosforylacja, oksydacja, acetylacja, deamidacja [7-10]. Według jednej z nowszych hipotez tzw. „reguły N-końca” [11] o okresie półtrwania cząsteczki białkowej decyduje N-końcowa reszta aminokwasowa. W komórkach eukariotycznych białka ulegają degradacji zgodnie z regułą N-końca po połączeniu z ubikwitiną², przy udziale zależnego od ATP kompleksu proteasomowego 26S³ [12]. Tempo degradacji może zależeć również od sekwencji przy C-końcu cząsteczki białka [13]. Poza sygnałami występującymi przy końcach łańcucha polipeptydowego, o stabilności białka mogą decydować wewnętrzne sekwencje aminokwasowe. W obrębie wielu białek, które ulegają szybkiej degradacji zlokalizowano tzw. sekwencje PEST — regiony bogate w prolinę (P), kwas glutaminowy (E), serynę (S), treoninę (T) [14, 15]. Fosforylacja regionów PEST może przyspieszać degradację niektórych białek [15].

W komórkach eukariotycznych funkcjonują dwa degradacyjne szlaki proteolityczne (Tab. 1) tj. lizosomalny [7, 16]/wakuolarny [10, 17, 18] (mniej selektywny) oraz pozalizosomalny (bardziej selektywny). W lizosomach degradacji ulegają białka pochodzące bądź z przestrzeni zewnątrzkomórkowych (w wyniku endocytozy pinocytozy) bądź z wnętrza komórki (w wyniku autofagocytozy lub selektywnego transportu). Miejscem degradacji tych białek, oprócz ostatecznych lizosomów, mogą być również prelizosomalne struktury szlaku endocytarnego [19]. Pozalizosomalny szlak proteolityczny obejmuje procesy degradacyjne zachodzące w cytosolu, przede wszystkim z udziałem kompleksu proteasomowego 26S [20, 21] i układu kalpainowego [6, 22], oraz proteolizę w obrębie orga-

Tabela 1.

Szlaki proteolizy w komórkach eukariotycznych

| Szlak proteolityczny | Przykłady enzymów |
|--|--|
| I. Szlak lizosomalny wakuolarny 1. lizosomalna degradacja białek endogennych (makroautofagocytoza, mikroautofagocytoza, krinofagocytoza, z udziałem białka hsc 73) 1a. proteoliza endosomalna 2. wakuolarna degradacja białek — proteoliza w wakuolach drożdży — proteoliza w wakuolach roślin | Katepsyny B, D, E, H, L PrA, PrB, CPY, CPS, API, APY, DPAP-B papaina, ficyna, bromelaina |
| II. Szlak pozalizosomalny 1. Procesy proteolizy w cytosolu — z udziałem 26S proteasomu — z udziałem systemu kalpainowego 2. Procesy proteolizy w organellach subkomórkowych — degradacja białek w mitochondriach — degradacja białek w chloroplastach — degradacja białek związana z retikulum endoplazmatycznym (ERAD) — proteoliza w aparacie Golgiego — proteoliza w błonach plazmatycznych | ATP-zależny kompleks proteasomowy 26S μ -CANP (u-CANP1), m-CANP (u-CANP2), μ /m-kalpainy, nCL-1 (t-CANPsk), nCL-2 (t-CANPsm) ATP-zależna endopeptydaza — homolog proteazy Lon <i>E. coli</i> , ATP-zależne proteazy spokrewnione z bakteryjną metaloproteazą FtsH ATP-zależna proteaza spokrewniona z bakteryjną proteazą Clp (proteaza ClpCP), proteaza homologiczna do bakteryjnej ATP-zależnej metaloproteazy FtsH proteasomy zależne od Ca ²⁺ serynowe proteazy typu subtylizyny (<i>maturases</i>) — np. furyna peptydazy sygnałowe — serynowe proteinyzy nie wymagające His (w błonach ER, mitochondriów, tylakoidów), sekretazy (<i>secretases</i> , <i>shedases</i>) |

nelli subkomórkowych tj. mitochondriów [23, 24], chloroplastów [10, 25, 26], retikulum endoplazmatycznego [1, 27], aparatu Golgiego [3, 10] oraz błon plazmatycznych [1, 5].

Przy omawianiu procesów proteolizy można wspomnieć również o wyspecjalizowanych komórkach, których potencjał proteolityczny jest często większy niż lizosomów, zwłaszcza w odniesieniu do białek egzogennych trawionych w neutralnym pH. Szczególnie ważne są takie komórki jak neutrofile, makrofagi

¹ O kalpainach pisała A. Jakubiec-Puka *Post Biochem* (1993) **39**: 251-258

² O ubikwitinie pisały: U. Piotrowska *Post Biochem* (1993) **39**: 8-16 oraz A. Tobiasz i T. Żołądek *Post Biochem* (1997) **43**: 91-97

O degradacji cyklin przy udziale systemu ubikwitinowego pisała B. Grzelakowska-Sztaber *Post Biochem* (1993) **39**: 16-25

³ O degradacji dekarboksylazy ornitynowej przez 26S proteasomy pisała M. Manteuffel-Cymborowska *Post Biochem* (1996) **42**: 113-120

[28, 29] czy osteoklasty [30, 31]. Zachowanie równowagi między serynowymi proteinazami uwalnianymi z neutrofilii i makrofagów a inhibitorami tych enzymów, z grupy serpin (*serpins*) [32-35], ma istotne znaczenie przy utrzymaniu homeostazy organizmu. Zakłócenie tej równowagi powoduje m.in. zaburzenia w metabolizmie tkanki łącznej, prowadzące np. do rozwoju chorób płuc [35, 36].

Omówienie wszystkich aspektów proteolizy jest niemożliwe w ramach tego opracowania. Ważne zagadnienia dotyczące udziału proteaz komórkowych — tzw. kaspaz w przebiegu apoptozy zostały opisane w artykułach opublikowanych wcześniej na łamach *Postępow Biochemii*⁴.

II. Lizosomalna degradacja białek

W lizosomach degradacji ulegają białka egzogenne jak również endogenne [7, 16]. Degradacja białek wewnątrzkomórkowych zachodzi głównie w warunkach stresu, np. głodu [37].

II-1. Szlaki proteolizy lizosomalnej

Białka wewnątrzkomórkowe mogą wnikać do lizosomów co najmniej na 4 różne sposoby: makroautofagocytozy, mikroautofagocytozy, krinofagocytozy [16], a także selektywnego transportu [38] z udziałem hsc 73 — konstytutywnego białka szoku termicznego o m. cząst. 73 kDa (*heat-shock cognate protein*) rozpoznającego specyficzne sekwencje aminokwasowe: Lys-Phe-Glu-Arg-Gln (tzw. KFERQ) [7, 39].

Makroautofagocytoza (klasyczna autofagocytoza) polega na pobraniu części cytoplazmy do wakuoli autofagocytowych, które powstają z błon pochodzących głównie z retikulum endoplazmatycznego gładkiego [38]. Utworzony w ten sposób autofagosom łączy się z lizosomem pierwotnym lub wtórnym, powodując powstanie autofagolizosomu [16, 17, 38, 40]. Udział lizosomalnej degradacji białek w wewnątrzkomórkowej proteolizie może w zależności od typu komórki wynosić do 80% [40]. Lizosomalna proteoliza jest procesem nieselektywnym [38], gdyż podlegają jej białka różnych struktur komórkowych, m.in. mitochondriów, peroksysomów, rybosomów, błon retikulum endoplazmatycznego, a także obecne w lizosomach białka rozpuszczalne [41]. Białka cytosolu są zaś głównie substratami cytosolowych szlaków proteolizy. Ostatnio wykazano [42], że również proteasomy ulegają degradacji w lizosomach, głównie na drodze autofagocytozy, chociaż w warunkach głodu prawdopodobnie także poprzez specyficzny transport z udziałem białka hsc 73. Uważa się, że proces makroautofagocytozy odpowiada raczej za dostosowanie

ogólnego poziomu białek wewnątrzkomórkowych do aktualnych potrzeb, niż za specyficzną regulację poziomu poszczególnych białek [7].

Mikroautofagocytoza polega na pobraniu małych porcji cytoplazmy lub cytosolu do pęcherzyków powstających przez inwaginację błony lizosomu, w wyniku czego następuje utworzenie wakuoli autofagocytowych wewnątrz lizosomu [7]. Podczas gdy proces makroautofagocytozy zachodzi głównie w warunkach głodu i jest regulowany przez poziom aminokwasów, to mikroautofagocytoza odpowiada za degradację białek długowiecznych w warunkach stanu podstawowego [7, 40].

Lizosomalna degradacja produktów sekrecji określana jest mianem krinofagocytozy [43]. Jest to proces polegający na fuzji pęcherzyków wydzielniczych z lizosomami lub translokacji białek sekrecyjnych bezpośrednio do lizosomów, zamiast do pęcherzyków wydzielniczych [7, 16, 43]. Krinofagocytoza może być dodatkowym mechanizmem regulacyjnym, zabezpieczającym komórkę przed przeciążeniem produktami wydzielniczymi, np. hormonami, gdy tempo sekrecji jest zbyt niskie [7, 43].

W warunkach długotrwałego głodu, białka dostają się do lizosomów w drodze selektywnego transportu z udziałem białka hsc 73 [38]. Białka rozpoznawane przez hsc 73 (np. rybonukleaza A) zawierają N-terminalną 20-aminokwasową sekwencję, w obrębie której znajduje się specyficzny region peptydowy obejmujący reszty od 7 do 11. W przypadku RNazy A jest nim pentapeptyd Lys-Phe-Glu-Arg-Gln, tzn. sekwencja (motyw) KFERQ [39]. Pokrewne sekwencje wykryto u około 30% białek cytosolowych, m.in. kilku enzymów glikolitycznych [41]. Podobne motywy są prawdopodobnie odpowiedzialne za selektywną degradację proteasomów w lizosomach [42].

II-2. Mechanizm proteolizy lizosomalnej

Degradacja białek wewnątrz lizosomów jest prawdopodobnie inicjowana przez endopeptydazy (proteinyazy), a kontynuowana przez lizosomalne egzopeptydazy: dipeptydylopeptydazy, karboksypeptydazy, dipeptydazy [44, 45]. Wśród wykrytych endopeptydaz stwierdzono proteinyazy cysteinowe, takie jak katepsyny B, H, L oraz aspartylowe, jak katepsyna D i E [45]. Największe znaczenie w wewnątrzlizosomalnej degradacji białek przypisuje się katepsynom D i L [45]. Na istotny udział proteinaz cysteinowych, poza aktywnymi w kwaśnym pH proteinazami aspartylowymi, wskazuje stopień zahamowania tej proteolizy przez specyficzne w stosunku do cysteinowych proteinaz inhibitory, jak np. E-64, leupeptyna.

III. Wakuolarna degradacja białek

Wakuole roślinne [10], podobnie jak wakuole drożdży [17, 46], zawierają różnorodne enzymy hydro-

⁴ O roli kaspaz w apoptozie pisali: B. Grzelakowska-Sztabert *Post Biochem* (1998) **44**: 8-21 oraz P. Widlak *Post Biochem* (1998) **44**: 252-254

lityczne i z tego względu są często uważane za funkcjonalne odpowiedniki lizosomów zwierzęcych. Ostatnie dane wskazują, że w roślinach występują dwa typy wakuoli, z których jeden charakteryzuje się kwaśnym pH podobnie jak lizosomy [10]. W wakuolach komórek roślin wykryto wszystkie rodzaje hydrolaz peptydylolitycznych. W wakuolach drożdży wykazano obecność dwóch endopeptydaz: aspartylowej proteiny A (PrA) i serynowej proteiny B typu subtilizyny (PrB), dwóch karboksypeptydaz: Y i S (CPY, CPS), dwóch aminopeptydaz I i Y (API, APY — prawdopodobnie identycznej z opisywaną wcześniej ApCo [18]) oraz dipeptydylowej aminopeptydazy B (DPAP-B) w błonie wakuoli [18, 47]. Szlaki biosyntezy wymienionych proteaz drożdży oraz potranslacyjne modyfikacje, obejmujące również zachodzący w wakuolach proces kaskadowej aktywacji odpowiednich proenzymów, opisano szczegółowo w pracy przeglądowej [18]. Uważa się, że w wakuolach mogą ulegać degradacji liczne białka cytosolowe o długim okresie półtrwania, szczególnie w warunkach głodu [48]. Wyspecjalizowane formy wakuoli roślinnych tzw. ciała białkowe (*protein bodies*), z których wyizolowano proteazy odpowiadające katepsynom ssaków, są głównym miejscem degradacji białek w kielkujących nasionach [10]. Ten sposób mobilizacji białek zapasowych obserwowano również w innych tkankach np. liściach, podczas niedoboru azotu lub w procesie starzenia [10]. Poziom wakuolarnych proteinaz u drożdży jest stosunkowo niski podczas wegetatywnego wzrostu i znacznie wzrasta w warunkach stresu wywołanego niedoborem podstawowych składników pokarmowych oraz przy sporulacji [18, 49]. W komórkach *Saccharomyces cerevisiae* tej wakuolarniej proteolizy ulegają np. permeaza uracylu [50] i transporter maltozy [51].

IV. Proteoliza endosomalna

Do niedawna sądzono, że degradacja makrocząsteczek pobranych na drodze endocytozy, jak również autofagocytozy, zachodzi wyłącznie w ostatecznych lizosomach. Najnowsze badania wykazały, że częściowa lub nawet całkowita hydroliza białek może mieć miejsce w prelizosomalnych strukturach szlaku endocytarnego (wczesnych i późnych endosomach) [19].

Endosomalnej proteolizie przypisuje się głównie [19, 52]: (a) aktywację lizosomalnych proteaz, takich jak katepsyny D i B, które mogą być zaangażowane w degradację białek w endosomach; (b) inaktywację hormonów białkowych, np. naskórkowy czynnik wzrostu EGF (*epidermal growth factor*) jest częściowo degradowany w strukturach prelizosomalnych, a następnie przenoszony do lizosomów w celu całkowitej degradacji, — insulina i glukagon są całkowicie degradowane w endosomach; (c) aktywację hormonów białkowych, np. parathormon — PTH (*parathyroid hormone*) jest aktywowany w endosomach na drodze

ograniczonej proteolizy; (d) udział w prezentacji antygenów.

V. Proteoliza zależna od ATP u *Prokaryota*

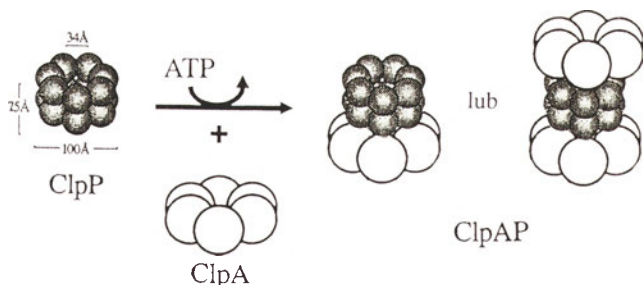
V-1. Proteaza Lon

Proteaza Lon (określana również jako La; [53]) będąca produktem genu *lon* (od ang. *long form*; [54]) *Escherichia coli* jest proteazą zależną od ATP, która pełni wiele funkcji regulacyjnych w tym organizmie [53]. Geny *lon* zidentyfikowano także u innych bakterii gramujemnych i gramododatnich [24]. Aktywna proteaza jest tetramerem zbudowanym z identycznych podjednostek, z których każda o m. cząst. 87 kDa zawiera centrum ATP-azy, jak również centrum proteazy serynowej [53, 55]. Aktywność ATP-azowa jest stymulowana przez DNA, a proteaza Lon wiąże się z DNA w sposób specyficzny — do bogatego w deoksytymidynę i deoksyguanozynę elementu promotora [24]. Funkcje regulatorowe proteazy Lon dotyczą m.in. oporności bakterii na promieniowanie, podziału komórkowego oraz proteolitycznej degradacji anormalnych polipeptydów i pewnych krótkożyjących białek regulatorowych takich jak inhibitory podziału komórkowego Sula i RcsA [24, 53]. Proteaza Lon została także zidentyfikowana jako element odpowiedzi *E. coli* na szok termiczny⁵ [53].

V-2. Proteaza Clp

Izolowana z *E. coli* proteaza Clp (*chaperone-linked protease*), znana również jako Ti [53], składa się z dwóch niehomologicznych podjednostek: proteolitycznej (ClpP) i regulatorowej o aktywności ATP-azy (ClpA lub ClpX) [10, 53, 56]. Podjednostka ClpP (o m. cząst. 21,5 kDa), zawiera proteolityczne centra aktywne, z których dwa są charakterystyczne dla katalitycznej triady proteaz typu serynowego [56]. Sama ClpP nie może hydrolizować białek, funkcjonuje ona jako peptydaza zdolna jedynie do degradowania krótkich peptydów (poniżej 7 aminokwasów) i do pełnej aktywności proteolitycznej wymaga połączenia z ClpA. Uważa się, że ClpX stymuluje aktywność ClpP w stosunku do substratów białkowych nie rozpoznawanych przez ClpA [56]. Podjednostka regulacyjna ClpA (o m. cząst. 84 kDa) jest ATP-azą wykorzystująca hydrolizę ATP do aktywacji ClpP i rozkładowania substratów białkowych [55, 56]. ATP związany przez ClpA z dwiema odmiennymi strukturalnie i funkcjonalnie domenami (ATP-1 i ATP-2) jest potrzebny w różnych etapach degradacji [56]. ATP-1 jest niezbędny do utworzenia stabilnych oligomerów ClpA i do aktywowania proteolizy przez ClpP, prawdopodobnie dzięki zmianom konformacyjnym wynikającym z wiązania nukleoty-

⁵ O odpowiedzi *E. coli* na szok termiczny pisał K. L i b e r e k *Post Biochem* (1995) **41**: 94-102



Ryc. 1. Schemat budowy proteazy ClpAP.
ClpP — podjednostka proteolityczna, ClpA — podjednostka regulatorowa
(Opracowano na podstawie danych literaturowych [10, 56])

du. ATP-2 jest w głównej mierze odpowiedzialny za zależne od energii etapy niezbędne w degradacji substratów białkowych. Podjednostka ClpA uważana jest za modelowe białko Clp z rodziny białek Clp/Hsp100 [56]. ClpA z *E. coli* może *in vitro* przejawiać funkcje charakterystyczne dla systemu białek opiekuńczych (*molecular chaperones*) Hsp70. Przypuszcza się, że ClpA funkcjonuje również jako białko opiekuńcze w obrębie proteazy Clp, udostępniając podjednostce proteolitycznej przeznaczone do degradacji białka w stanie rozfałdowanym. Pierwotnie przypuszczano, że zarówno ClpP jak i ClpA tworzą *in vitro* heksameryczne pierścienie, które asocjują przejściowo podczas proteolizy. Wykazano jednak, że ClpP jest tetradekamerem tworzącym dwa pierścienie — każdy po 7 monomerów, natomiast w świetle ostatnich danych ClpA nadal przypisuje się konfigurację heksameryczną, co implikuje asymetryczne ułożenie oligomerów ClpP i ClpA [10, 56]. Uważa się zatem, że w obecności ATP proteaza ClpAP składa się z tetradekameru ClpP zasocjowanego z jednego lub obu końców z heksamerem ClpA (Ryc. 1), przypominając swoją strukturą 26S proteasom u *Eukaryota* i *Archaeobacteria* (por. Ryc. 2). Wnętrze kompleksu ClpP jest prawdopodobnie wystarczająco szerokie, by wiązać duże rozfałdowane polipeptydy, ale zbyt ograniczone, by wiązać nawet małe, pofałdowane białka [56]. Niezdolność do wiązania natywnych polipeptydów byłaby zatem przyczyną niemożności samodzielnego degradowania białek przez ClpP. Proteaza Clp bierze udział w degradacji niefunkcyjnych polipeptydów i spontanicznie pojawiających się agregatów białkowych [56] zgodnie z regułą N-końca [57].

V-3. Proteaza FtsH

Proteaza FtsH (określana również jako HflB; [58]) jest produktem genu *ftsH* (od ang. *filamentation temperature sensitive*; [59]), który okazał się identyczny z genem *hflB* (od ang. *high frequency of lysogeny*; [58]). FtsH jest ATP-zależną metaloproteazą o masie cząst. 74 kDa, zaangażowaną w odpowiedzi *E. coli* na szok termiczny (patrz przypis⁵) oraz uczestniczącą w degradacji niecałkowicie uformowanych białek *E. coli* [26]. FtsH jest białkiem zakotwiczonym w błonie

cytoplazmatycznej dwiema transbłonowymi helisami, z miejscem wiązania ATP i domeną katalityczną skierowanymi do cytosolu. Domena ATP-azowa należy do rodziny AAA—ATP-az związanych z różnymi aktywnościami komórkowymi (*ATPases Associated with various cellular Activities*), a domena proteazowa zależna jest od jonów cynku [60].

VI. Pozalizosomalna proteoliza zależna od ATP u *Eukaryota*

VI-1. ATP-zależna proteoliza w mitochondriach

W mitochondriach wątroby szczurów wykazano [53] obecność proteolitycznej aktywności zależnej od ATP. Enzym odpowiedzialny za tę aktywność okazał się endopeptydazą o m. cząst. 550 kDa, aktywną w alkalicznym pH tylko w obecności jonów Mg^{2+} i ATP, wykazującą szereg podobieństw do proteazy Lon *E. coli* [23]. Homologi Lon wykryto również w mitochondriach drożdży (*S. cerevisiae*) i człowieka [24]. Są one u tych organizmów kodowane przez genom jądrowy. Enzymy te są zaangażowane w degradację anormalnych białek syntetyzowanych w mitochondriach i niektórych enzymów mitochondrialnych o krótkim okresie półtrwania [23].

W mitochondriach drożdży wykryto również dwie, zlokalizowane w wewnętrznej błonie, ATP-zależne proteazy spokrewnione z bakteryjną ATP-zależną metaloproteazą EtsH [60], które uczestniczą w degradacji nie w pełni uformowanych białek mitochondrialnych i niecałkowicie zsintetyzowanych polipeptydów [25, 26]. Jedna z nich jest białkiem heteromultimerycznym sięgającym do matriksu, a druga homomultimerem skierowanym do przestrzeni międzybłonowej.

VI-2. ATP-zależna proteoliza w chloroplastach

Chloroplasty zawierają do 50% wszystkich białek tkanki fotosyntetyzującej. Przypuszczano, że białka chloroplastów są degradowane przez proteazy wakuolarnie [10] lub na szlaku ubikwitynowym [48]. Jednak obecnie wydaje się, że w procesie degradacji zaangażowane są występujące w chloroplastach proteazy, z których pewne wymagają ATP [10, 25, 61] (obserwowano również ATP-niezależną proteolizę [25, 62]). Szybka degradacja białek w chloroplastach ma miejsce np. gdy kompleks składający się z kilku podjednostek pozbawiony jest jednej z nich.

Jedną z chloroplastowych proteaz zależnych od ATP jest spokrewniona z bakteryjną proteazą Clp. Białka homologiczne do podjednostek ClpP i ClpA wykryto w stromie chloroplastów. Podjednostka proteolityczna ClpP jest kodowana przez genom chloroplastowy (u pomidorów — w jądrze [25]), a podjednostka regulatorowa, oznaczana u roślin jako ClpC [10], przez genom jądrowy. Podobnie jak u *E. coli*,

asocjacja pomiędzy ClpC i ClpP zależy od obecności ATP. Ostatnio stwierdzono, że stanowiąca około 10% subpopulacja ClpC jest zasocjowana z wewnętrzną błoną chloroplastu. Ekspresja podjednostek proteazy Clp jest konstytutywna [61, 63], chociaż w przypadku ClpC obserwowano pewną stymulację światłem [63]. Przypuszcza się, że proteaza ClpCP pełni u roślin funkcje białka „gospodarczego” (*housekeeping*), podczas gdy ClpC funkcjonuje także niezależnie jako białko opiekuńcze [25].

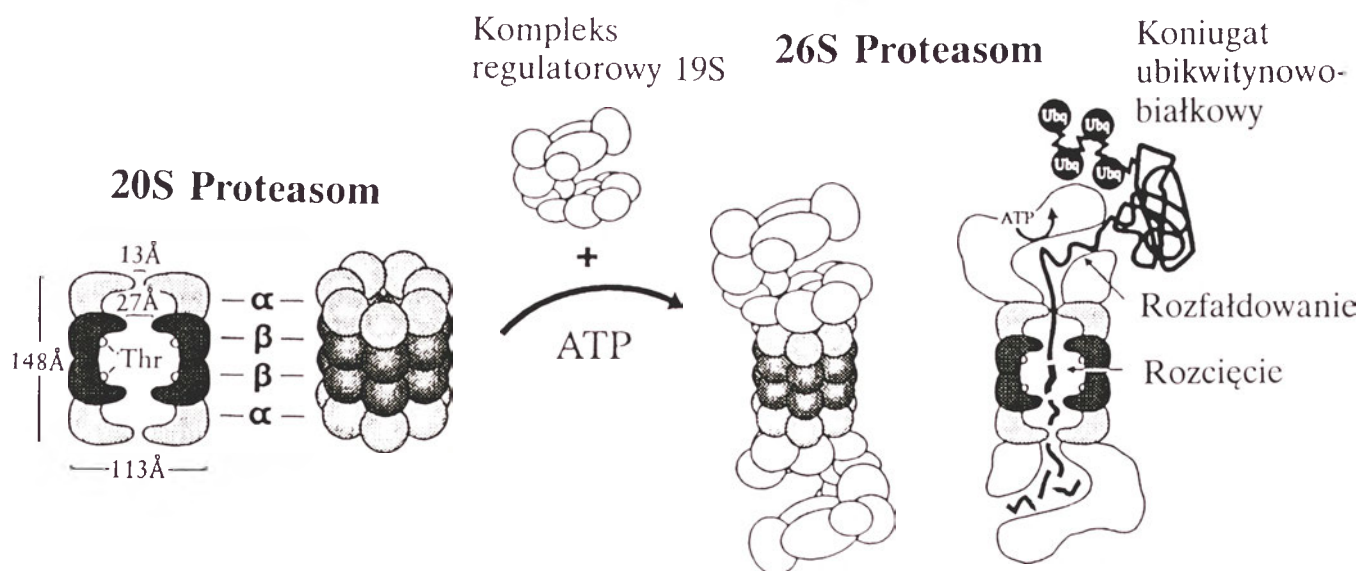
Ostatnio zidentyfikowano w chloroplastach kilku roślin wyższych białko o m. cząst. 78 kDa, wykazujące immunologiczne podobieństwo do bakteryjnej ATP-zależnej metaloproteazy FtsH, którego ekspresja zależy od światła (brak go u roślin etiolowanych) [26]. Jest ono integralnym białkiem błony tylakoidu, z hydrofilową częścią wyeksponowaną ku stromie. Geny tej proteazy znaleziono w chloroplastach krasnorostów i brunatnic, natomiast u zielenic i roślin wyższych białko to jest kodowane w jądrze i importowane do chloroplastu. Transbłonowa lokalizacja sugeruje udział tej proteazy w degradacji zarówno rozpuszczalnych białek stromy jak też nowo wbudowywanych białek tylakoidów.

VI-3. Proteoliza z udziałem 26S proteasomu

Główny nielizosomalny szlak degradacji białek stanowi duży (2 MDa) ATP-zależny kompleks proteolityczny — 26S proteasom (26S proteaza, 26S kompleks proteasomowy), który wykryto w cytosolu i jądrze wszystkich komórek eukariotycznych [20, 60, 64-67]. Kompleks ten składa się z 20S proteasomu (700 kDa) [68] tworzącego proteolityczny rdzeń w kształcie cylindra (beczulki) oraz zasocjowanych na jego końcach dwóch asymetrycznych kompleksów regulatorowych o stałej sedymentacji 19S tzw. „19S caps” (okreś-

lanych również jako PA700 lub μ particle) (Ryc. 2). Kompleksy „19S caps” zawierają ok. 15-20 różnych podjednostek (dokładna liczba nadal nie jest znana) o m. cząst. 25-110 kDa [52, 56], mają aktywności ATP-azowe [65, 69], wiążące ubikwitynę [70] oraz izopeptydazowe [70, 71]. Dotychczas zidentyfikowano 6 blisko spokrewnionych podjednostek o aktywności ATP-az, zaliczanych do rodziny białek AAA [65] określanych też jako CAD — białka zawierające konserwatywną domenę ATP-azową (*Conserved ATP-ase containing Domain proteins*) [72]. Podjednostki te prawdopodobnie biorą udział w dysocjowaniu i rozfałdowywaniu substratów białkowych przed ich translokacją do rdzenia proteolitycznego. Określane są ze względu na pełnioną funkcję jako „*unfoldases*” lub „*reverse chaperones*” [60]. Inne podjednostki kompleksu „*cap*” odpowiedzialne za selektywność proteolizy są zaangażowane w rozpoznawaniu substratów białkowych niosących sygnały do degradacji. Kowalencyjne przyłączenie ubikwityny (z utworzeniem łańcucha multiubikwitynowego) do białka substratowego jest zasadniczym [9, 21, 70, 73], lecz nie wyłącznym [74] (patrz również przypis³), sygnałem do proteolizy.

Podczas gdy obecność kompleksów 26S stwierdzono dotychczas jedynie w komórkach eukariotycznych, to 20S proteasomy — ATP niezależne proteazy wykryto poza *Eukaryota*, również u *Archaeobacteria* np. *Thermoplasma acidophilum* [68, 75] oraz niektórych *Eubacteria* (*Actinomycetes*) np. *Rhodococcus erythropolis* [65, 75]. Wiadomo, że prokariotyczne 20S proteasomy mogą degradować jedynie całkowicie rozfałdowane białka [76], jednak mechanizm rozpoznawania i rozfałdowywania substratów nie jest dokładnie poznany. Należy dodać, iż najnowsze badania nad udziałem proteasomów w schorzeniach układu nerwowego typu choroby Alzheimera [77, 78] wskazują, że białko β amyloidu tworzy bezpośredni kompleks



Ryc. 2. Schemat budowy proteasomu 20S i 26S.

Thr — treonina w centrum aktywnym. Ubq — ubikwityna. (Reprodukowano z: *Plant Molecular Biology*, vol. 32, © 1996, p. 283, *Proteolysis in plants: mechanisms and functions*, Vierstra R.D. [10], fig. 4, za pozwoleniem Kluwer Academic Publishers oraz R.D. Vierstry. Zmodyfikowano)

z katalitycznym wnętrzem proteasomu, co sugeruje odmienne, w stosunku do prokariotycznych, wymagania eukariotycznych proteasomów dotyczące konformacji degradowanych polipeptydów [78].

Molekularna architektura 20S proteasomu ma charakter konserwatywny, pomimo wzrastającej w toku ewolucji złożoności w składzie podjednostek. Większość prokariotycznych 20S proteasomów zbudowana jest z dwóch rodzajów podjednostek: α i β [68], chociaż u *Rhodococcus* stwierdzono dwa typy podjednostek α (α_1 , α_2) i dwa typy podjednostek β (β_1 , β_2) [75]. Eukariotyczne 20S proteasomy zawierają 14 różnych, ale spokrewnionych podjednostek, które mogą być klasyfikowane na podstawie podobieństwa sekwencji — jako podjednostki typu α lub β [75]. Proteasomy kręgowców osiągnęły nawet wyższy stopień złożoności: oprócz podjednostek konstytutywnych istnieje kilka indukcyjnych podjednostek typu β , które mogą zastępować ich konstytutywne odpowiedniki i w ten sposób wpływać na specyficzność substratową [65]. 20S proteasom tworzy cylindryczny kompleks składający się z 28 podjednostek ułożonych w cztery współosiowe 7-członowe pierścienie (patrz Ryc. 2). Dwa zewnętrzne pierścienie tworzą podjednostki α , a dwa wewnętrzne — podjednostki β ($\alpha\text{-}\beta\text{-}\beta\text{-}\beta\text{-}\alpha$) [65, 68]. Eukariotyczny proteasom 20S jest złożonym dimerem o symetrii C2, a lokalizacja podjednostek typu α i β w obrębie odpowiednich pierścieni nie jest przypadkowa, lecz określona przez sąsiednie podjednostki [79].

Katalityczna aktywność proteasomu ograniczona jest do podjednostek β . Uformowany przez pierścienie podjednostek wewnętrzny kanał tworzy (połączone przewężeniami) trzy wydrążenia, z których środkowe chroni centra aktywne. Budowa centrum aktywnego 20S proteasomu pozwala zaliczyć go do rodziny białek nowego rodzaju, określanych jako Nth hydrolazy (*N-terminal nucleophile hydrolases*) [60, 65], których wspólną cechą jest centrum aktywne tworzone przez pojedynczą resztę: ta sama N-końcowa reszta aminokwasowa dostarcza ugrupowanie nukleofilowe i pełni funkcję akceptora protonów. W proteasomie jest to reszta Thr1, a dodatkowo wymagana jest Lys33 i Glu17. Udział treoniny stał się również podstawą do wyodrębnienia piątej grupy enzymów proteolitycznych — proteinaz treoninowych [80]. W przeciwieństwie do podjednostek α , większość prokariotycznych i eukariotycznych podjednostek typu β jest syntetyzowana w formie nieaktywnych prekursorów, które muszą ulec ograniczonej proteolizie w procesie „dojrzewania proteasomu”, uwalniając resztę centrum aktywnego [79, 81]. Usuwanie propeptydów (4-70 reszt) następuje drogą autolizy dopiero po zamknięciu podjednostki typu β w obrębie kompleksu.

Kompleks proteasomowy 26S jest zaangażowany w degradację nieprawidłowo zbudowanych i zdenaturowanych białek, jak też białek o krótkim okresie półtrwania istotnych w procesie proliferacji komórki

i regulacji cyklu komórkowego [82]. Ponadto 26S proteasomy mają bezpośredni wpływ na regulację transkrypcji poprzez przekształcanie NF κ B i degradację I κ B, jak również poprzez proteolizę czynników transkrypcyjnych takich jak c-Eos i c-Jun. Ostatnio wykazano ściśle powiązanie mechanizmu kontrolującego progresję cyklu komórkowego i mechanizmów aktywujących program śmierci komórkowej [83]. Uzyskane wyniki wskazują, że 26S proteasom zajmuje kluczową pozycję funkcjonując jako „przełącznik”, decydujący o tym czy komórka przystąpi do proliferacji czy też podda się apoptozie.

VII. Proteoliza z udziałem kalpain

Kalpains scharakteryzowano jako wewnątrzkomórkowe neutralne proteinazy cysteinowe (EC 3.4.22.17), które do aktywności proteolitycznej wymagają jonów Ca^{2+} CANP [6, 22, 84]. Enzymy te są szeroko rozpowszechnione w świecie zwierząt. W przeciwieństwie do większości proteaz hydrolizują tylko 1 lub 2 wiązania w białkach [85] i w drodze ograniczonej proteolizy zmieniają aktywność lub funkcjonowanie białek substratowych [6]. Kalpains uczestniczą w takich procesach fizjologicznych, jak: przenoszenie sygnałów, różnicowanie komórek, regulacja cyklu komórkowego oraz w procesach patologicznych, np. w chorobach zwyrodnieniowych mięśni i nerwów, w rozwoju nadciśnienia, w procesie powstawania katarakty [6, 84]. Kalpains, podobnie jak wspomniane wcześniej kaspazy czy proteasomy, są zaangażowane w przebieg apoptozy [84].

Podział izolowanych z tkanek ssaków kalpain na dwa powszechnie występujące typy: μ - i m- (aktywne odpowiednio przy μ -molarnych i m-molarnych stężeniach Ca^{2+}), został zmieniony po odkryciu nowego rodzaju kalpainy — p94 (nCL-1), której obecność stwierdzono jedynie w mięśniach szkieletowych. Kolejny tego typu enzym wyizolowano z żołądka [6]. Zaproponowany w związku z tymi odkryciami podział [86] kalpain obejmował dwie grupy: kalpains powszechnie występujące (konwencjonalne) i tkankowo-specyficzne (nowe). Do pierwszej grupy należą μ -kalpains, m-kalpains oraz wykryte tylko w tkankach kurcząt μ /m-kalpains [87], o pośredniej w stosunku do μ - i m-kalpain wrażliwości na Ca^{2+} . Do tkankowo-specyficznych kalpain zaliczono n-kalpainę-1 (nCL-1) oraz izolowane z żołądka n-kalpainę-2 i n-kalpainę-2'.

Zgodnie z najnowszą propozycją nazewnictwa [22] powszechnie występujące kalpains (*ubiquitous calpains*) oznacza się jako u-CANP1 (poprzednio μ -CANP) i u-CANP2 (poprzednio m-CANP). W przypadku tkankowo-specyficznych enzymów, licząc się z odkryciem nowych izoform, po akronimie t-CANP stosuje się kod literowy identyfikujący tkankę lub organ, np. izoforma specyficzna dla mięśni szkieletowych powinna być oznaczana jako t-CANPsk (dotychczas nCL-1, p 94), a w przypadku mięśni gładkich jako

t-CANPsm (dotychczas nCL-2).

Kalpainy powszechnie występujące (u-CANPs) są enzymami heterodimerycznymi składającymi się z dużej (80 kDa) podjednostki katalitycznej, w obrębie której wyróżnia się 4 domeny (I-IV) oraz małej podjednostki regulatorowej (30 kDa) zawierającej dwie domeny (IV i V). N-końcowe domeny podjednostki dużej i małej (I i V), ulegają autoproteolizie w obecności Ca^{2+} .

Tkankowo-specyficzne kalpainy uważa się za enzymy istniejące w formach monomerów lub oligomerów podjednostki katalitycznej [84]. Kalpaina nCL2' ze względu na brak domeny IV określana jest jako atypowa [84].

W przeciwieństwie do powszechnie akceptowanego faktu, że *in vitro* rozcinanie substratów przez CANP jest zawsze poprzedzone jej aktywacją uwarunkowaną autoproteolizą domen I i V, mechanizm aktywacji kalpain *in vivo* nadal nie jest w pełni wyjaśniony. Autoproteolityczne rozcinanie podjednostek katalitycznych i regulatorowych wymaga stężenia Ca^{2+} co najmniej o rząd wielkości większego od fizjologicznego stężenia Ca^{2+} panującego w cytosolu. Tę sprzeczność próbują wyjaśnić różne hipotezy. Jedna z nich zakłada, że kalpaina w postaci dimeru 80/30 kDa występuje w tkankach jako nieaktywny proenzym, który w obecności Ca^{2+} ulega autokatalitycznemu przekształceniu do aktywnej postaci CANP 76/18 kDa (z produktem pośrednim autolizy podjednostki katalitycznej o masie 78 kDa) [22]. Cytosolowe czynniki aktywujące (białka, fosfolipidy, DNA) miałyby być odpowiedzialne za obniżenie stężenia Ca^{2+} niezbędnego do autolizy. Według innej hipotezy, aktywacja CANP jest niezależna od jej autolizy, wymaga asocjacji z błoną komórkową i kończy się dysocjacją podjednostki regulatorowej od katalitycznej [22, 84]. Y o s h i z a w a i w s p. [88, 89] wykazali, że kalpainy dysocjują na podjednostki w obecności jonów Ca^{2+} w stężeniu wymaganym do wyrażenia aktywności [88], oraz że oddysocjowana podjednostka 80 kDa posiada pełną aktywność enzymatyczną [89]. *In vivo* autoliza może nie być obligatoryjna, a asocjacja z błonami biologicznymi mogłaby wystarczać do uwolnienia centrum aktywnego i uczynienia go dostępnym dla substratów przy fizjologicznym stężeniu Ca^{2+} . Nieodwracalny proces autolizy może mieć miejsce *in vivo* tylko w warunkach ekstremalnych takich jak nekroza komórki lub apoptoza, podczas gdy aktywacja w normalnych warunkach komórkowych może po prostu odzwierciedlać odwracalną asocjację proteiny z błoną (i/lub cytoszkieletem), gdzie substraty mogą być rozcinane w odpowiedzi na ograniczone zmiany cytosolowego stężenia Ca^{2+} . Zatem możliwe jest funkcjonowanie kalpain *in vivo* jako monomerów podjednostek 80 kDa, jak również w autolizowanej formie 76 kDa.

Dodatkowym mechanizmem kontroli proteolitycznej aktywności CANP mógłby być poziom fosforylacji defosforylacji jej endogennego inhibitora (kalpas-

tatyny) [22]. Kalpastatyna blokuje zaktywowaną nieodwracalnie formę 78 kDa, która opuszcza błonę po autolizie i która jeśli jest przekształcona w aktywną formę 76 kDa mogłaby być niebezpieczna dla komórki. Niedawno zaproponowano model aktywacji m-kalpainy na drodze kaskady kalpainowej [90].

VIII. Proteoliza w retikulum endoplazmatycznym

W endoplazmatycznym retikulum (ER) ma miejsce przekształcanie prebiałek lub preprobiałek: wszystkie białka sekrecyjne, lizosomalne, większość integralnych białek błonowych jest syntetyzowana w postaci prekursorów zawierających N-końcową sekwencję sygnałową (presekwencję), której odszczepienie odbywa się zwykle kotranslacyjnie przy udziale endopeptydazy, należącej do nowego typu proteinaz serynowych (nie wymagającej His) [2], która jest umiejscowiona na wewnętrznej cysternowej powierzchni błony retikulum endoplazmatycznego. Odszczepiony prepeptyd ulega natychmiastowej proteolizie do wolnych aminokwasów [1].

Kontrola jakościowa nowo syntetyzowanych białek zapewnia, że tylko prawidłowo sfałdowane, odpowiednio uformowane białka opuszczają retikulum endoplazmatyczne i są dalej transportowane poprzez szlak sekrecyjny. Większość białek nie osiągających stanu odpowiedniego do tego transportu ulega degradacji [91] na szlaku określanym jako ERAD (*ER-associated protein degradation pathway*) [27], który jest wysoce selektywny w stosunku do niecałkowicie uformowanych lub nieprawidłowych białek. Wykazano, że kalneksyna (*calnexin*) — białko opiekuńcze retikulum endoplazmatycznego odgrywa istotną rolę w procesie degradacji białek związanych z ER, co wskazywałoby iż właśnie białka tej klasy determinują selektywność substratową [92]. Chociaż poprzednie badania sugerowały, że w omawianym procesie degradacji uczestniczą niezidentyfikowane proteazy zlokalizowane w retikulum endoplazmatycznym, to najnowsze dane wskazują na udział proteasomów [27, 92, 93]. Stwierdzono, że degradacja nieprawidłowych białek retikulum endoplazmatycznego zachodzi w cytoplazmie [27]. Udowodniono również udział proteasomów w degradacji integralnego białka błon — transbłonowego regulatora mukowiscydozy CFTR (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*) [92]. Lokalizacja kompleksów proteasomowych zaangażowanych w degradację białek związaną z retikulum endoplazmatycznym mogłaby nie ograniczać się do cytosolu, ponieważ udokumentowano możliwość wykrywania proteasomów w strukturach *pre-Golgi* [94].

IX. Proteoliza w aparacie Golgiego

Istotny etap w procesie dojrzewania białek stanowi przekształcanie prekursorów białek sekrecyjnych i li-

zosomalnych (probiałek) w ostateczną postać. Jest ono związane z odcinaniem dodatkowego peptydu tzw. sekwencji propeptydowej w miejscu wyznaczonym przez parę aminokwasów zasadowych, zwykle Lys-Arg lub Arg-Arg, rzadziej Arg-Lys, Lys-Lys [3, 10]. U wyższych *Eukaryota* w proteolitycznym przekształcaniu prekursorów białek biorą udział zależne od jonów Ca^{2+} serynowe proteazy typu subtylizyny, stanowiące nową rodzinę komórkowych proteinaz określanych jako „convertases” lub „maturases” [4]. Wykryto 5 tego typu proteaz spokrewnionych z bakteryjną proteazą KEX2: PC2, PC3/PC1, PC4, furynę, PACE4 [3, 10]. Są one integralnymi białkami błony w aparacie Golgiego [95] i odpowiadają za przekształcanie prekursorów prawie wszystkich neuropeptydów i hormonów peptydowych, wielu czynników wzrostu i ich receptorów, a także toksyn komórkowych [3].

X. Uwagi końcowe

Dane dotyczące bakteryjnych, roślinnych i zwierzęcych systemów proteolitycznych wskazują, że organizacja tych systemów i sposoby rozpoznawania białek docelowych często mają charakter zachowawczy. Pozwala to na tworzenie pewnej „bazy danych” z informacji uzyskiwanych przy badaniu organizmów należących do różnych królestw. Możliwość wykorzystywania zebranych informacji ma znaczenie zarówno dla badań podstawowych, jak również przy opracowywaniu strategii terapeutycznych w stosunku do schorzeń, w rozwoju których istotną rolę odgrywa proteoliza.

Praca wykonana w ramach działalności statutowej Zakładu Biochemii UMCS, przy wsparciu Komitetu Badań Naukowych, KBN BS/BiNoZ/4.

Artykuł otrzymano 5 lutego 1998 r.

Zaakceptowano do druku 30 listopada 1998 r.

Piśmiennictwo

- Müller M (1992) *Experientia* **48**: 118-129
- Dalbey RE, von Heijne G (1992) *Trends Biochem Sci* **17**: 474-478
- Smeekens SP (1993) *Biotechnology* **11**: 182-186
- Steiner DF, Smeekens SP, Ohagi S, Chan SJ (1992) *J Biol Chem* **267**: 23435-23438
- Hooper NM, Karran EH, Turner AJ (1997) *Biochem J* **321**: 265-279
- Saido TC, Sorimachi H, Suzuki K (1994) *FASEB J* **8**: 814-822
- Olson TS, Terlecky SR, Dice JF (1992) W: Ahern TJ, Manning MC (red) *Stability of Protein Pharmaceutics Part B*. Plenum Press, New York, str. 89-118
- Bohley P, Kirschke H, Langner J, Mische M, Riemann S, Salama Z, Schön E, Wiederanders B, Ansorge S (1979) W: Holzer H, Tschesche H (red) *Biological Functions of Proteinases*. Springer-Verlag, Berlin, str. 17-34
- Jennissen HP (1995) *Eur J Biochem* **231**: 1-30
- Vierstra RD (1996) *Plant Mol Biol* **32**: 275-302
- Varshavsky A (1992) *Cell* **69**: 725-735
- Hershko A, Ciechanover A (1992) *Annu Rev Biochem* **61**: 761-807
- Parsell DA, Silber KR, Sauer RT (1990) *Gene Dev* **4**: 277-286
- Rogers S, Wells R, Rechsteiner M (1986) *Science* **234**: 364-368
- Marchal C, Haguenaer-Tsapis R, Urban-Grimal D (1998) *Mol Cell Biol* **18**: 314-321
- Marzella L, Glaumann H (1987) W: Glaumann H, Ballard FJ (red) *Lysosomes: Their Role in Protein Breakdown*. Academic Press, London, str. 319-367
- Harding TM, Morano KA, Scott SV, Klionsky DJ (1995) *J Cell Biol* **131**: 591-602
- van den Hazel HB, Kielland-Brandt MC, Wintner JR (1996) *Yeast* **12**: 1-16
- Berg T, Gjøen T, Bakke O (1995) *Biochem J* **307**: 313-326
- Coux O, Tanaka K, Goldberg AL (1996) *Annu Rev Biochem* **65**: 801-847
- Varshavsky A (1997) *Trends Biochem Sci* **22**: 383-388
- Molinari M, Carafoli E (1997) *J Membr Biol* **156**: 1-8
- Goldberg AL (1987) W: Glaumann H, Ballard FJ (red) *Lysosomes: Their Role in Protein Breakdown*. Academic Press, London, str. 715-721
- Fu GK, Smith MJ, Markowitz DM (1997) *J Biol Chem* **272**: 534-538
- Adam Z (1996) *Plant Mol Biol* **32**: 773-783
- Lindahl M, Tabak S, Cseke L, Pichersky E, Andersson B, Adam Z (1996) *J Biol Chem* **271**: 29329-29334
- Werner ED, Brodsky JL, McCracken AA (1996) *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 13797-13801
- Zimmerman M (1979) W: Holzer H, Tschesche H (red) *Biological Functions of Proteinases*. Springer-Verlag, Berlin, str. 186-195
- Tyagi SC (1997) *Mol Cell Biol* **168**: 1-12
- Birkedal-Hansen H (1995) *Curr Opin Cell Biol* **7**: 728-735
- Christenson RH (1997) *Clin Biochem* **30**: 573-593
- Potempa J, Korzus E, Travis J (1994) *J Biol Chem* **269**: 15957-15960
- Korpula-Mastalerz R, Dubin A (1996) *Acta Biochim Polon* **43**: 419-430
- Polanowski A, Wilusz T (1996) *Acta Biochim Polon* **43**: 445-454
- Kowalska A (1993) *Post Biochem* **39**: 236-242
- Bingle L, Richards RJ, Fox B, Masek L, Guz A, Tetley TD (1997) *Mediat Inflamm* **6**: 345-354
- Ciechanover A (1994) *Biol Chem Hoppe-Seyler* **375**: 565-581
- Dice JF, Terlecky SR (1994) W: Ciechanover AJ, Schwartz AL (red) *Modern Cell Biology t 15 — Cellular Proteolytic Systems*. Wiley-Liss, New York, str. 55-64
- Dice JF (1990) *Trends Biochem Sci* **15**: 305-309
- Seglen PO, Bohley P (1992) *Experientia* **48**: 158-172
- Cuervo AM, Dice JF (1998) *J Mol Med* **76**: 6-12
- Cuervo AM, Palmer A, Rivett AJ, Knecht E (1995) *Eur J Biochem* **227**: 792-800
- Bienkowski RS (1983) *Biochem J* **214**: 1-10
- Kirschke H, Barret AJ (1987) W: Glaumann H, Ballard FJ (red) *Lysosomes: Their Role in Protein Breakdown*. Academic Press, London, str. 193-238
- Bohley P, Seglen PO (1992) *Experientia* **48**: 151-157
- Conibear E, Stevens TH (1995) *Cell* **83**: 513-516
- Jones EW (1991) *J Biol Chem* **266**: 7963-7966
- Vierstra RD (1993) *Annu Rev Plant Physiol* **44**: 385-410
- Teichert U, Mechler B, Müller H, Wolf DH (1989) *J Biol Chem* **264**: 16037-16045
- Volland C, Galan J-M, Urban-Grimal D, Devillers G, Haguenaer-Tsapis R (1994) *SMYTE* **39**: 554-557
- Riballo E, Herweijer M, Wolf DH, Lagunas R (1995) *J Bacteriol* **177**: 5622-5627
- Fineschi B, Miller J (1997) *Trends Biochem Sci* **22**: 377-382
- Goldberg AL (1992) *Eur J Biochem* **203**: 9-23
- Zehnbauser B, Markovitz A (1978) *ICN-UCLA Symp Mol Cell Biol* **9**: 797-800
- Maurizi MR (1992) *Experientia* **48**: 178-201
- Clarke AK (1996) *J Biosci* **2**: 161-177
- Tobias JW, Shrader TE, Rocap G, Varshavsky A (1991) *Science* **254**: 1374-1377

58. Herman C, Thevenet D, D'Ari R, Bouloc P (1995) *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 3516-3520
59. Tomoyasu T, Yuki T, Morimura S, Mori H, Yamana K, Niki H, Hiraga S, Ogura T (1993) *J Bacteriol* **175**: 1344-1351
60. Lupas A, Flanagan JM, Tamura T, Baumeister W (1997) *Trends Biochem Sci* **22**: 399-404
61. Ostersetzer O, Tabak S, Yarden O, Shapira R, Adam Z (1996) *Eur J Biochem* **236**: 932-936
62. Zagdańska B, Wiśniewski T (1996) *Acta Biochim Polon* **43**: 515-520
63. Ostersetzer O, Adam Z (1996) *Plant Mol Biol* **31**: 673-676
64. Hochstasser M (1996) *Annu Rev Genet* **30**: 405-439
65. Baumeister W, Lupas A (1997) *Curr Opin Struct Biol* **7**: 273-278
66. Tanaka K (1998) *J Biochem* **123**: 195-204
67. Kłyszczko-Stefanowicz L (1995) Cytobiochemia. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa str. 536-553
68. Włodawer A (1995) *Structure* **3**: 417-420
69. Hoffman L, Rechsteiner M (1996) *J Biol Chem* **271**: 32538-32545
70. Ciechanover A (1994) *Cell* **79**: 13-21
71. Kam YA, Xu W, DeMartino GN, Cohen RE (1997) *Nature (Lond)* **385**: 737-740
72. Swaffield JC, Bromberg JF, Johnston SA (1992) *Nature (Lond)* **357**: 698-700
73. Wilkinson KD (1995) *Annu Rev Nutr* **15**: 161-189
74. Murakami Y, Matsufuji S, Takaaki K, Hayashi S, Igarashi K, Tamura T, Tanaka K, Ichihara A (1992) *Nature (Lond)* **360**: 597-599
75. Zühl F, Tamura T, Dolenc I, Cejka Z, Nagy I, De Mot R, Baumeister W (1997) *FEBS Lett* **400**: 83-90
76. Wenzel T, Baumeister W (1995) *Nature Struct Biology* **2**: 199-204
77. Gregori L, Goldgaber D (1997) W: Iqbal K, Winblad B, Nishimura T, Takeda M, Wisniewski HM (red) *Alzheimer's Disease: Biology, Diagnosis and Therapeutics*. John Wiley & Sons Ltd, str. 465-475
78. Gregori L, Hainfeld JF, Simon MN, Goldgaber D (1997) *J Biol Chem* **272**: 58-62
79. Schmidtke G, Kraft R, Kostka S, Henklein P, Frömmel C, Löwe J, Huber R, Kloetzl PM, Schmidt M (1996) *EMBO J* **15**: 6887-6898
80. Seemüller E, Lupas A, Stock D, Löwe J, Huber R, Baumeister W (1995) *Science* **268**: 579-582
81. Chen P, Hochstrasser M (1995) *EMBO J* **14**: 2620-2630
82. Udvardy A (1996) *Eur J Biochem* **240**: 307-313
83. Drexler HC (1997) *Proc Natl Acad Sci USA* **94**: 855-860
84. Suzuki K, Sorimachi H, Yoshizawa T, Kinbara K, Ishiura S (1995) *Biol Chem Hoppe-Seyler* **376**: 523-529
85. Stabach PR, Cianci CD, Glanz SB, Zhang Z, Morrow JS (1997) *Biochemistry* **36**: 57-65
86. Sorimachi H, Saido TC, Suzuki K (1994) *FEBS Lett* **343**: 1-5
87. Sorimachi H, Tsukahara T, Okada-Ban M, Sugiura H, Ishiura S, Suzuki K (1995) *Biochim Biophys Acta* **1261**: 381-393
88. Yoshizawa T, Sorimachi H, Tomioka S, Ishiura S, Suzuki K (1995) *FEBS Lett* **358**: 101-103
89. Yoshizawa T, Sorimachi H, Tomioka S, Ishiura S, Suzuki K (1995) *Biochem Biophys Res Commun* **208**: 376-383
90. Tompa P, Baki A, Schäd É, Friedrich P (1996) *J Biol Chem* **271**: 33161-33164
91. Bonifacino JS, Klausner RD (1994) W: Ciechanover AJ, Schartz AL (red) *Modern Cell Biology*, t 15 — Cellular Proteolytic Systems. Wiley-Liss, New York, str. 137-160
92. Jensen TJ, Loo MA, Pind S, Williams DB, Goldberg AL, Riordan JR (1995) *Cell* **83**: 129-135
93. Sommer T, Wolf DH (1997) *FASEB J* **11**: 1227-1233
94. Oda K, Ikehara Y, Omura S (1996) *Biochem Biophys Res Commun* **219**: 800-805
95. Franzusoff A, Redding K, Crosby J, Fuller RS, Schekman R (1991) *J Cell Biol* **112**: 27-37



Do członków Polskiego Towarzystwa Biochemicznego

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

Urokinazowy układ aktywacji plazminogenu i jego znaczenie w progresji nowotworów

Urokinase plasminogen activation system and its role in cancer progression

JANUSZ BŁASIAK¹,
BEATA SMOLARZ²,
DAGMARA PIESTRZENIEWICZ³

Spis treści:

- I. Wprowadzenie
- II. Urokinazowy szlak aktywacji plazminogenu
- III. Aktywator plazminogenu typu urokinazowego
III-1. Białko i gen
III-2. uPa i nowotwory
- IV. Inhibitor aktywatorów plazminogenu typu 1
IV-1. Białko i gen
IV-2. Rola w progresji nowotworów
- V. Receptor aktywatora plazminogenu typu urokinazowego
V-1. Białko i gen
V-2. Znaczenie w progresji nowotworów
- VI. Regulacja ekspresji genów układu aktywacji plazminogenu przez onkogeny
- VII. Układ aktywacji plazminogenu jako cel terapii antynowotworowej
- VIII. Uwagi końcowe

Contents:

- I. Introduction
- II. Urokinase pathway of plasminogen activation
- III. Urokinase-type plasminogen activator
III-1. The protein and the gene
III-2. uPa and cancer
- IV. Plasminogen activator inhibitor type 1
IV-1. The protein and the gene
IV-2. The role in cancer progression
- V. Urokinase-Type Plasminogen Activator Receptor
V-1. The protein and the gene
V-2. The role in cancer progression
- VI. Regulation of plasminogen activation system expression by oncogenes
- VII. Plasminogen activation system as a target for anticancer therapy
- VIII. Concluding remarks

Wykaz stosowanych skrótów: ECM — macierz zewnątrzkomórkowa, uPa — aktywator plazminogenu typu urokinazowego, urokinaza; pro-uPa — proenzym uPa, prourokinaza; uPAR — receptor uPA; PAI-1 i PAI-2 — inhibitory aktywatorów plazminogenu typu 1 i 2; EGF — naskórkowy czynnik wzrostu; HGF — czynnik wzrostu hepatocytów; HMW uPA — dwułańcuchowa forma uPA o dużej masie cząsteczkowej; LMW uPA — dwułańcuchowa forma uPA o małej masie cząsteczkowej; uPAR — receptor aktywatora plazminogenu typu urokinazy; tPA — tkankowy aktywator plazminogenu; pz — pary zasad; IL — interleukina; TGF — transformujący czynnik wzrostowy, PLAUr — gen receptora aktywatora plazminogenu typu urokinazowego; UTS — obszar nie podlegający translacji.

I. Wprowadzenie

Progresja nowotworów, obejmująca inwazję i metastazę, jest złożonym, wieloetapowym procesem, zawierającym odłączenie komórek nowotworowych od pierwotnego miejsca, ich migrację przez naczynia krwionośne lub węzły chłonne, adhezję do elementów macie-

rzy komórkowej i zewnątrzkomórkowej (ECM) organów docelowych, degradację proteolityczną białek macierzowych i proliferację komórkową (przełącz w [1]). Z ECM może oddziaływać szereg enzymów — zarówno tych, które są integralną częścią macierzy, jak i związanych z zewnętrzną stroną błony plazmatycznej komórek. Funkcje proteolityczne tych enzymów są regulowane przez odpowiednie inhibitory, które razem z enzymami kształtują biochemiczną charakterystykę ECM. W procesie progresji nowotworów oddziaływanie pomiędzy komórkami nowotworowymi i ECM jest niezbędne. Przy tworzeniu odległych przerzutów konieczne jest naruszenie połączeń międzykomórkowych w guzie pierwotnym, a uwolnione komórki muszą mieć zdolność do pokonywania barier w postaci ECM, wyściółki guza i ścian naczyń. Aby oddziaływania te były możliwe, konieczne są zmiany w ECM, które zachodzą przy udziale enzymów proteolitycznych uwalnianych przez komórki rakowe [2, 3].

Progresja guza pierwotnego obejmuje trzy główne etapy: przyłączenie i oddziaływanie komórek rakowych z elementami błony podstawnej i ECM, lokalną proteolizę i migrację komórek nowotworowych [4].

¹ Dr hab., ² mgr, ³ studentka V roku genetyki w Katedrze Genetyki Molekularnej Uniwersytetu Łódzkiego, ul. Banacha 12/16, 90-237 Łódź

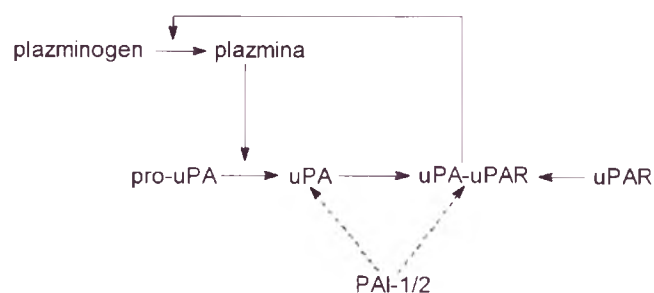
Proteoliza może zachodzić przy udziale proteaz czterech klas: (1) metaloproteaz macierzowych: kolagenaz, żelatynaz i stromielizyn [5-8]; (2) proteaz cysteinyowych: katepsyn B i L [9-13]; (3) proteazy aspartylowej katepsyny D [14-16] oraz proteaz serynowych, w tym składników urokinazowego układu aktywacji plazminogenu [17-21]. Potencjalnie duża rola układu aktywacji plazminogenu w procesach inwazji nowotworów jest przedmiotem zainteresowań od kilkadziesiąt lat (przeгляд w [17]).

II. Urokinazowy szlak aktywacji plazminogenu

Głównymi składnikami urokinazowego układu aktywacji plazminogenu są: aktywator plazminogenu typu urokinazowego (uPA), jego receptor (uPAR) i inhibitory (PAI-1 i PAI-2) (Ryc. 1).

Aktywator plazminogenu typu urokinazowego jest proteazą serynową uwalnianą z komórek w postaci nieaktywnego proenzymu (pro-uPA) jako pojedynczy łańcuch polipeptydowy [22]. Receptor pro-uPA ulega transformacji proteolitycznej do dwułańcuchowej, aktywnej formy uPA, która przekształca nieaktywny zymogen plazminogen do aktywnej plazminy. Plazmina może aktywować pro-uPA, jednakże mechanizm pierwotnej aktywacji pro-uPA w warunkach fizjologicznych nie został jeszcze dokładnie wyjaśniony. Zarówno pro-uPA jak i uPA mogą się łączyć ze specyficznym komórkowym receptorem powierzchniowym, uPAR [23-25], co przy wiązaniu plazminogenu ze swym receptorem, znacznie zwiększa tempo powstawania plazminy [25, 26]. Aktywność uPA jest regulowana przez inhibitory aktywatorów plazminogenu typu 1 (PAI-1) i typu 2 (PAI-2) oraz neksynę [27]. Kompleksy uPA- inhibitor są internalizowane przez komórki w procesie zależnym m.in. od uPAR [28, 29].

Wyniki badań immunohistochemicznych fragmentów tkanki z guzów złośliwych wskazują na obecność składników układu aktywacji plazminogenu na powierzchni komórek biorących bezpośredni udział w inwazji guza oraz komórkach wyściółki guza [30]. Sugeruje to istnienie złożonych oddziaływań pomiędzy komórkami guza i wyściółki w procesie inwazji nowo-



Ryc. 1. Uproszczony schemat urokinazowego układu aktywacji plazminogenu. uPA — aktywator plazminogenu typu urokinazowego; pro-uPA — proenzym uPA; uPAR — receptor uPA; PAI-1/2 — inhibitor aktywatorów plazminogenu typu 1 lub 2. Linie ciągłe symbolizują aktywację, linie przerywane — hamowanie.

tworów. Podobne oddziaływanie ma miejsce przy przemieszczaniu się komórek prawidłowych, jednakże komórki nowotworowe charakteryzują się wyższym poziomem ekspresji receptorów aktywatorów plazminogenu, co pociąga za sobą większą ilość aktywnych enzymów proteolitycznych na powierzchni komórek rakowych [31]. Poza tym należy odróżnić przemieszczanie się komórek prawidłowych od inwazji komórek rakowych, która ma charakter czynnej penetracji ECM.

III. Aktywator plazminogenu typu urokinazowego

III-1. Białko i gen

Aktywator plazminogenu typu urokinazowego, uPA (urokinaza), jest proteazą serynową o masie cząsteczkowej 55 kDa, zawierającą 411 reszt aminokwasowych. Fragment C-końcowy cząsteczki uPA zawiera centrum aktywne, natomiast fragment N-końcowy — domenę *kringle* i domenę mającą strukturę nabłonkowego czynnika wzrostu (EGF). Urokinaza przekształca nieaktywny zymogen plazminogen w plazminę, która bierze udział w degradacji białek ECM [17, 32]. Aktywator uPA jest uwalniany przez komórki prawidłowe i nowotworowe jako jednołańcuchowy zymogen (pro-uPA, prourokinaza), nie wykazujący aktywności proteolitycznej. Trawienie szkieletu białka pro-uPA, mogące być katalizowane m.in. przez plazminę, prowadzi do powstania aktywnej dwułańcuchowej formy uPA o dużej masie cząsteczkowej, HMW uPA, która na skutek dalszego trawienia może ulec przekształceniu w dwułańcuchową formę uPA o małej masie cząsteczkowej, LMW uPA, i fragment aminokońcowy zawierający domenę *kringle* i domenę EGF [4]. Zarówno pro-uPA, jak i uPA mogą być wiązane z takim samym powinowactwem do powierzchniowego receptora aktywatora plazminogenu typu urokinazowego (uPAR).

Gen uPA człowieka znajduje się w dłuższym ramieniu chromosomu 10 i zawiera 6,4 kpz [33]. W genie tym znajduje się jedenaście eksonów o długości 87, 87, 27, 107, 174, 91, 219, 148, 140, 148 i 1105 pz przedzielonych intronami o długości 305, 416, 145, 602, 192, 156, 220, 664, 345 i 988 pz. W obszarze promotorowym genu występują powtórzenia *Alu*, sekwencje wzmacniające i wyciszające [34]. Ponadto, obszar promotorowy zawiera sześci nukleotydową sekwencję GGCGGG, powtarzającą się trzykrotnie pomiędzy kasetami CAAT i TATA, mogącą mieć znaczenie dla aktywności promotora [35]. Znane są dwa rodzaje polimorfizmu genu uPA: zamiana C na T w eksonie 8 i rzadziej występujący, powodujący zastąpienie leucyny przez prolinę w domenie *kringle* [36].

III-2. uPA a nowotwory

Komórki, w których zachodzi ekspresja uPA mogą

być identyfikowane przez hybrydyzację *in situ* lub metodami histochemicznymi. Badania rozkładu cząsteczek uPA w guzach nowotworowych, pozwoliły na stwierdzenie jego dużej niejednorodności — największa gęstość cząsteczek znajdowana była zazwyczaj w obszarach peryferyjnych guzów, obejmujących miejsca kontaktu z tkanką prawidłową [37]. Wskazuje to, że uPA, obecny przede wszystkim na „inwazyjnych krawędziach” guza, bierze czynny udział w progresji nowotworów. Ilość uPA wytwarzanego przez komórki rakowe jest dodatkowo skorelowana z ich inwazyjnością — co zostało potwierdzone w szeregu badań przeprowadzonych zarówno na tkance rakowej, jak i liniach komórek nowotworowych o różnym stopniu złośliwości [38]. Możliwe jest zatem ustanowienie korelacji pomiędzy poziomem uPA i zróżnicowaniem guza, będącym podstawowym parametrem decydującym o jego złośliwości, a tym samym inwazyjności. Obok zróżnicowania pod uwagę mogą być także brane zaawansowanie kliniczne nowotworu oraz występowanie lub brak przerzutów. Potwierdzają to wyniki badań, w których stwierdzony wyższy poziom uPA w rakach żołądka dających przerzuty, niż w rakach bez przerzutów [39]. Podobnie, w glejaku guzy o wysokim (3 lub 4) stopniu zaawansowania wykazywały od czterech do pięciu razy większą zawartość urokinazy od guzów o mniejszym zaawansowaniu (2 stopień) [40]. Ponadto stwierdzono znacząco wyższy poziom aktywności uPA w ogniskach wtórnych nowotworów w porównaniu z normalną tkanką i guzami pierwotnymi [41, 42].

Związek poziomu uPA z obrazem klinicznym nowotworu pozwala na rozważanie możliwości zastosowania go jako markera transformacji nowotworowej. Zaobserwowano, że wysoki poziom uPA korelował z krótszym czasem całkowitego przeżycia pacjentów z rakiem sutka [43]. Stwierdzono, że 93% chorych na raka sutka z niskim poziomem PAI-1 przeżywało 3 lata po radykalnym zabiegu bez objawów choroby, natomiast wśród chorych z wysokim poziomem uPA odsetek ten wynosił tylko 55% [44]. Urokinaza może być użytecznym markerem raka sutka, szczególnie w przypadku pacjentów z dodatnimi receptorami estrogenowymi, zarówno bez przerzutów jak i z przerzutami do węzłów chłonnych [45]. Poza rakiem sutka poziom uPA może być markerem wielu nowotworów złośliwych, m.in. raku płuc [46, 47], pęcherza moczowego [48], jelita grubego [49], szyjki macicy [50], jajników [51], nerek [52], mózgu [53], prostaty [54] i innych [55].

Degradacja ECM przy udziale uPA może następować w wyniku trawienia składników ECM: lamininy i kolagenu typu IV przez plazminę powstałą na skutek aktywacji plazminogenu przez uPA [56]. uPA może także aktywować czynnik wzrostu hepatocytów (HGF) [57], który jest homologiczny sekwencyjnie z uPA i występuje w formie jednołańcuchowej mitogenicznie nieaktywnej lub w aktywnej formie dwułań-

cuchowej. Forma jednołańcuchowa jest trawiona przez uPA, co powoduje aktywację HGF, który wówczas staje się silnym mitogenem i może stymulować angiogenezę. Wykazano, że wysoki poziom uPA jest dodatnio skorelowany z indukcją angiogenezy i inwazją naczyniową [58], wobec czego uPA może brać udział w progresji nowotworów przez mechanizm z udziałem HGF.

IV. Inhibitor aktywatorów plazminogenu typu 1

IV-1. Białko i gen

Inhibitor aktywatorów plazminogenu typu 1, PAI-1, jest glikoproteiną o masie 50 kDa, należąca do nadrodziny inhibitorów proteaz serynowych, Serpin [59]. Jednołańcuchowa cząsteczka PAI-1 zawiera 379 reszt aminokwasowych i jest inhibitorem aktywatorów plazminogenu: tkankowego (tPA) i urokinazowego. cDNA PAI-1 koduje prebiałko o długości 402 aminokwasów, zawierające 23 aminokwasowy hydrofobowy fragment sygnałny, po strawieniu którego przy N-końcowej reszcie serynowej pozostaje 379 aminokwasowe białko stanowiące cząsteczkę PAI-1 [82]. PAI-1 jest syntetyzowany głównie przez komórki śródbłonna, megakariocyty, komórki naczyniowe mięśni gładkich i komórki wątroby [60].

Gen *PAI-1*, znajdujący się w 7q21.3-q22, ma 12,3 kbp, tworzących 9 eksonów rozdzielonych 8 intronami [60]. Długość eksonów zawiera się w przedziale 84-1823 pz, długość intronów wynosi od 119 pz do 1764 pz. W genie *PAI-1* zidentyfikowano 12 sekwencji, które charakteryzują się wysokim stopniem homologii z powtórzeniami *Alu* oraz powtarzające się długie odcinki polipurynowe. Obszar flankujący od strony 5' genu *PAI-1* zawiera elementy regulacyjne typu *cis*: odcinki CCAAT i TATAA oraz sekwencje homologiczne z elementami wzmacniającymi transkrypcję u eukariontów. Obszary genu nie podlegające translacji (UTS) od strony 5' i 3' liczą odpowiednio 145 i 1800 pz, a 3'-UTS zawiera kilka miejsc poliadenylacji. Gen *PAI-1* należy do genów polimorficznych — znanych jest jego 8 polimorfizmów (Tab. 1) [61]. Przypuszcza się, że polimorfizm 4G/5G w regionie promotora genu PAI-1 może mieć funkcjonalne znaczenie w regulacji jego ekspresji [61].

PAI-1 może odgrywać istotną rolę zarówno w regulacji procesów fizjologicznych jak i patologicznych.

IV-2. Rola w progresji nowotworów

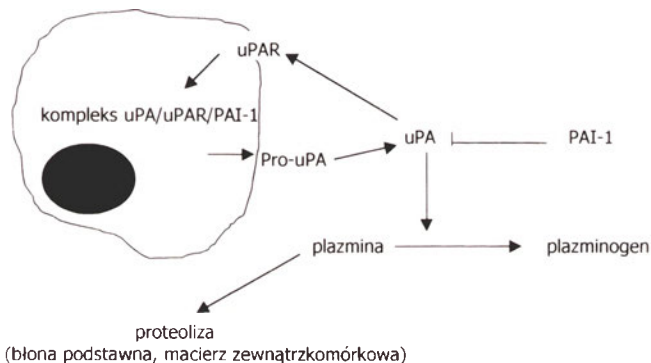
Inhibitor PAI-1 reguluje aktywność uPA, jednego z kluczowych enzymów proteolitycznych biorących udział w metastazie. Regulacja następuje poprzez tworzenie kompleksu kowalencyjnego enzym-inhibitor, przy czym hamowaniu podlega zarówno wolny uPA jak i związany ze swoim receptorem, uPAR [62]. Rola PAI-1 w biologii nowotworów nie jest jeszcze

Tabela 1.

Polimorfizmy genu PAI-1.

| Miejsce | Rodzaj podstawienia | Sekwencja alleli |
|------------------------|--|---|
| -844 | A → G | -855 – CAGCTCGA <u>A</u> GAAAGT – |
| -675 | 4G → 5G | -855 – CAGCTCGA <u>G</u> GAAAGT – -680 – CGT <u>GGGG</u> AGTCAGCC -680 – CGT <u>GGGGG</u> AGTCAGC |
| -200 | (CA) _n | sekwencje powtarzające się w regionie promotora |
| +6320 | (CA) _n | sekwencje powtarzające się w intronie IV |
| +9785 | A → G | +9782 CC <u>A</u> CCTGGGCGACAG +9782 CC <u>G</u> CCTGGGCGACAG |
| +11320 | insercja/delecja sekwencji 9-nukleotydowej | +11320 <u>CGCGCCCCCGCGC</u> +11320 GCGC |
| w końcowym obszarze 3' | RFLP <i>Hind</i> III | istnienie lub brak dodatkowego miejsca restrykcyjnego dla <i>Hind</i> III w obszarze końcowym 3' |
| +11053 | G → T | +11044 GGAAGAA <u>A</u> GTCAGA +11044 GGAAGAA <u>T</u> GTCAGA |

Komórka nowotworowa



Ryc. 2. Schemat wzajemnych oddziaływań pomiędzy aktywatorem plazminogenu typu urokinazowego, uPA, jego receptorem, uPAR i inhibitorem PAI-1 w procesie migracji komórek nowotworowych. Aktywacja jest oznaczona strzałkami, natomiast hamowanie – figurą w kształcie obróconej litery T.

dokładnie określona. Wyniki niektórych badań sugerują, że PAI-1 chroni komórki nowotworowe przed degradacją proteolityczną, która obejmuje wtedy przylegające komórki prawidłowe umożliwiając inwazję nowotworów [62]. PAI-1 może wiązać się ze znajdującym się na powierzchni komórek kompleksem uPAR/uPA, tworząc w ten sposób nieaktywny enzymatycznie trójskładniowy kompleks receptor-proteaza-inhibitor (Ryc. 2), który jest internalizowany przez komórki nowotworowe [4]. Tempo uwalniania PAI-1 zwiększają cytokiny pochodzące z komórek nowotworowych i naciekających guzy makrofagów. Wzrost aktywności PAI-1 obserwowano w różnych nowotworach: raku sutki, szyjki macicy, jajników, żołądka, okrężnicy, płuc, mózgu, nerek [4]. Korelacja poziomu PAI-1 z przebiegiem klinicznym raka jest podstawą stosowania stężenia PAI-1 jako markera w wielu chorobach nowotworowych. Pacjenci chorzy na nowotwory są zaliczani do grupy wysokiego, bądź niskiego ryzyka zależnie od poziomu PAI-1 we wczesnym stadium nowotworu [4].

Do podwyższonej ekspresji genu *PAI-1*, obserwowanej w wielu chorobach nowotworowych, może przyczyniać się polimorfizm 4G/5G, ze względu na

swoje położenie w pozycji – 675 obszaru promotorowego, którego sekwencja może określać charakter oddziaływania z 5 obszaru promotorowego, którego sekwencja może określać charakter oddziaływania z czynnikami transkrypcyjnymi, wpływającego na ekspresję genu. Wyniki badań wstępnych wskazują, że również warianty konstytutywne genu *PAI-1* mogą mieć znaczenie dla ryzyka wystąpienia choroby nowotworowej [63].

Trudno jest podać przyczynę zwiększonego poziomu PAI-1 w nowotworach złośliwych, tym bardziej, że w niektórych badaniach obserwowano hamowanie inwazji nowotworów przez PAI-1 [64]. Ten zmienny efekt PAI-1 może być związany z wpływem nadmiernej aktywacji plazminogenu na inwazję nowotworów. Obecny w nadmiarze w stosunku do swego receptora uPA nie tylko nie stymulował lecz hamował inwazję; podobny efekt obserwowano w układach modelowych, gdy na skutek różnic gatunkowych nie następowało wiązanie uPA z uPAR [65]. Zatem wytwarzanie dużej ilości plazminy może powodować degradację ECM do stopnia, który zagraża adhezji komórek potrzebnej przy ich przemieszczaniu. Podobnie, pomimo, że duże ilości PAI-1 mogą chronić ECM przed inwazją przez proteolityczne działanie plazminy, niewielkie ilości PAI-1 mogą osłaniać białka ECM niezbędne dla przemieszczania się komórek. Zaproponowano także, że PAI-1 może modulować wiązanie uPAR z ECM, wskutek czego komórka rakowa przemieszcza się w sposób oscylacyjny, będąc na przemian wiązana i odłączana od ECM.

V. Receptor aktywatora plazminogenu typu urokinazowego

V-1. Białko i gen

Receptor uPAR został zidentyfikowany po raz pierwszy w monocytach jako amfifilny, pojedynczy łańcuch polipeptydowy wiążący z dużym powinowac-

twem (5×10^{-10} M) N-końcowy fragment uPA [23, 29, 66].

W wiązaniu uPA z uPAR bierze udział domena EGF uPA [27]. uPAR jest glikoproteiną kodowaną jako polipeptyd składający się z 355 aminokwasów, który jest przekształcany do łańcucha zawierającego 283 aminokwasów [67]. uPAR składa się z trzech domen o takiej samej strukturze, należących do nadrodziny białek Ly-6/uPAR, charakteryzujących się występowaniem mostków disiarczkowych pomiędzy równoodległymi resztami cysteinowymi. Jak do tej pory udało się określić trójwymiarową strukturę tylko jednego członka rodziny Ly-6/uPAR, białka CD59 [68], potwierdzając szereg przypuszczeń o podobieństwie strukturalnym tego białka, jak również innych białek rodziny Ly-6/uPAR, do rodziny α -neurotoksyn z jadu żmij [69, 70]. Podobieństwa te pozwoliły na określenie hydrofobowych miejsc wiązania w uPAR [69, 70].

Pierwotnie zakładano, że fragment N-końcowy uPAR zawiera wszystkie elementy potrzebne do wiązania uPA [71], jednakże zasadnicze znaczenie dla tego procesu ma trójdomenowa struktura receptora, co zostało wykazane przez identyfikację Tyr⁵⁷ jako części miejsca wiązania uPA [70]. W badaniach z zastosowaniem rozpuszczonego uPAR stwierdzono jednakże, że uwolnienie domeny 1 uPAR zmniejsza jej zdolność do wiązania uPA około 1500 razy, co wskazuje na możliwość uczestniczenia w wiązaniu także pozostałych domen [69].

Gen *uPAR*, często nazywany *PLAUR*, znajduje się w obszarze chromosomowym 19q13.1-13.2 [72] i zawiera siedem eksonów i sześć intronów [73]. Eksony o długości 101, 111, 144, 162, 135, 147 i 563 pz są rozdzielone intronami o długości 2,04, 2,62, 8,42, 0,906, 3,10 i 2,78 kpz. Eksony 1-7 kodują polipeptydy zawierające odpowiednio 19, 37, 48, 54, 45, 49 i 83 aminokwasów. W genie *PLAUR* zlokalizowano wyspy CpG i sekwencje związane z czynnikami transkrypcyjnymi AP-1, AP-2 i c-Jun, lecz brak jest informacji dotyczących sekwencji będących potencjalnymi miejscami kaset TATA i CAAT [73]. Znane polimorfizmy genu *PLAUR* to powtórzenia CA/GT w intronie 3 [74] oraz polimorfizmy długości fragmentów restrykcyjnych *Pst*I [72] i *Eco*RI [75].

V-2. Znaczenie w progresji nowotworów

Jak podkreślano poprzednio, degradacja EMC konieczna dla progresji nowotworów, jest rezultatem oddziaływania pomiędzy komórkami rakowymi i komórkami błony podstawnej. Jeżeli w oddziaływaniu tym bierze udział uPA, to jego działanie proteolityczne zależy od tego czy jest on związany ze swoim receptorem, czy występuje w formie niezwiązanej. Wynika stąd, że progresja nowotworów może zależeć od lokalizacji uPAR. Potwierdzają to wyniki badań, w których na 60 przypadków inwazyjnego raka sutka typu

przewodowego w 49 stwierdzono umiejscowienie uPAR w komórkach rakowych lub w ich bezpośrednim sąsiedztwie [76]. W innych badaniach z zastosowaniem przeciwciał poliklonalnych dla uPAR, stwierdzono immunoreaktywność uPAR w 49 na 59 badanych przypadków inwazyjnego raka sutka [77]. Dodatkowo stwierdzono ekspresję uPAR w makrofagach infiltrujących guzy w 21 przypadkach. Podobny rezultat uzyskano w badaniach nad gruczolakorakami jelita grubego [78].

Potencjalny udział uPAR w progresji nowotworów skłania do rozważenia możliwości jego zastosowania jako markera. W raku jelita grubego, poziom uPAR może być uważany za niezależny marker prognostyczny [79]. Również w raku sutka wysoki poziom uPAR jest związany z krótszymi okresami remisji i krótszym okresem przeżycia [80, 81]. Co więcej, poziom uPAR może być niezależnym markerem prognostycznym w płaskonabłonkowym raku płuca, jednakże nie odgrywa on takiej roli w wielkokomórkowych rakach tego narządu [82]. Przyczyna takiego zróżnicowania nie została jeszcze wyjaśniona. Stwierdzono także, że wysoki poziom uPAR w szpiku kostnym chorych na nowotwory żołądka może być silnie związany z nawrotami choroby, co również nie jest łatwo jednoznacznie wyjaśnić [83]. Użycie poziomu receptora uPAR jako markera prognostycznego w chorobach nowotworowych jest oparte na jego roli jaką odgrywa on w progresji nowotworów i rezultatach badań klinicznych, jednakże konieczne są dalsze badania dla bardziej precyzyjnego określenia jego przydatności jako markera.

VI. Regulacja ekspresji genów układu aktywacji plazminogenu przez onkogeny

Jeżeli zmiany funkcjonowania układu aktywacji plazminogenu obserwowane w nowotworach złośliwych są z nimi jednoznacznie związane, to przyczynami tych zmian, przynajmniej w części, mogą być czynniki genetyczne wpływające na przebieg transformacji nowotworowej. Wśród nich istotne mogą być te, które wpływają na ekspresję genów kodujących białka układu aktywacji plazminogenu. Ekspresja tych genów może być regulowana przez niektóre onkogeny i ich produkty, w tym takie, o których wiadomo, że odgrywają rolę w progresji nowotworów, tak jak ma to miejsce w regulacji ekspresji genu *uPA* przez *Tpr*-*Met*, biorące udział w metastazie [84].

W regulacji syntezy i uwalniania PAI-1 bierze udział wiele czynników, jednakże mechanizm leżący u podstaw tej regulacji nie jest jeszcze dokładnie poznany [85]. Czynnikiem transkrypcyjnym mogącym wpływać na regulację ekspresji genu *PAI-1* przez aktywatory kinazy białkowej C, takie jak sole forbolu lub czynniki wzrostu, jest białko AP-1 [86]. AP-1 jest albo homodimerem białka Jun albo heterodimerem białek Jun i Fos i może być aktywatorem transkrypcji genów,

które w obszarze promotorowym mają sekwencję TGAgcTCA [87]. Obszar flankujący od strony 5' genu *PAI-1* zawiera cztery potencjalne miejsca wiązania elementu AP-1: sekwencję TGAGTTCA w pozycji od -58 do -50, sekwencję TGAGTGA w pozycji -79 do -72, sekwencję TGACACA w pozycji -721 do -714 oraz sekwencję TGTATCA w pozycji -662 do -656 [88]. W regulacji ekspresji genów układu aktywacji plazminogenu może brać udział szereg onkogenów i ich produktów, m.in. *v-mos*, *nm23*, *c-erbB-2*, *c-Jun*, *v-ras* [89, 90].

Jeżeli ekspresja genów układu aktywacji plazminogenu może być regulowana przez onkogeny, to mogą one przyczyniać się do zmian funkcjonowania tego układu w nowotworach złośliwych. Zmiany w onkogenach sprzyjają promocji transformacji nowotworowej, a zmienione onkogeny oddziałują z genami układu aktywacji plazminogenu, zwiększając ich ekspresję, co doprowadza do zwiększonego poziomu proteaz w guzie i jego otoczeniu, co z kolei przyczynia się do progresji nowotworu: inwazji i metastazy. Regulacja ekspresji przez onkogeny może zależeć od wersji polimorficznej danego genu, co może mieć znaczenie dla rokowania w raku. Jeżeli bowiem wśród alleli danego genu znajdzie się taki, którego ekspresja na skutek oddziaływania z aktywnymi onkogenami lub ich produktami będzie podwyższona w stosunku do innych alleli, to jego wykrycie np. we krwi, pozwoli na dobór odpowiedniej terapii, np. radykalnego zasięgu chirurgicznego z następującymi po nim chemio- i radioterapią. Dodatkowa terapia nie musiałaby towarzyszyć operacji, w przypadku wystąpienia wersji allelicznej, której ekspresja jest utrzymywana na niezmiennym poziomie bez względu na proces transformacji nowotworowej w komórce. Stwarza to potencjalne możliwości wykorzystania polimorfizmów genów układu aktywacji plazminogenu jako łatwo dostępnych markerów prognostycznych w chorobach nowotworowych. Można rozważać również sytuację, w której allel o normalnym poziomie ekspresji, ulega mutacji na skutek procesów transformacji nowotworowej. Wersja zmutowana genu może być podatna na oddziaływanie z onkogenami lub ich produktami, powodujący podwyższony poziom jego ekspresji. W takiej sytuacji zmieniona wersja genu, nie będąca wersją konstytutywną, nie mogłaby być wykrywana we krwi, lecz jedynie w tkance objętej procesem nowotworowym, jednakże także wówczas możliwe jest zastosowanie polimorfizmów genów układu aktywacji plazminogenu jako markerów prognostycznych w raku.

VII. Układ aktywacji plazminogenu jako cel terapii antynowotworowej

Z przeprowadzonych wcześniej rozważań wynika, że wartości stężenia białek układu aktywacji plazminogenu mogą być traktowane jako markery pro-

gnostyczne w chorobach nowotworowych. Jako potencjalne markery mogą też być rozważane polimorfizmy kodujących je genów. Oprócz tego można rozważać składniki układu aktywacji plazminogenu i kodujące je geny jako cel terapii antynowotworowej. W świetle danych o roli tego układu w progresji nowotworów, celem tak ukierunkowanej terapii byłoby ograniczenie inwazyjności nowotworów i ich zdolności do metastazy.

Terapia przeciwnowotworowa może być realizowana przez zastosowanie substancji hamujących wiązanie uPA do swego receptora, uPAR, i w ten sposób ograniczenie proteolitycznej aktywności uPA [91]. Efekt ten może być również osiągnięty przez specyficzne hamowanie aktywności enzymatycznej uPA lub modyfikację innych niż proteolityczne funkcji uPA i uPAR [92].

W dotychczas przeprowadzonych badaniach dotyczących składników układu aktywacji plazminogenu jako celu terapii antynowotworowej stosunkowo dużą grupę badań stanowią eksperymenty z zastosowaniem terapii genowej. Stosując transfer cDNA *PAI-1* do komórek czerniaka w myszach przy użyciu adenowirusa zaobserwowano zmniejszenie o połowę liczby zwierząt, u których następował wzrost przerzutów w wątrobie, natomiast u zwierząt z rozwiniętymi ogniskami przerzutowymi w 78% obserwowano zahamowanie dalszego ich wzrostu [93]. Obok zachęcających wyników tych badań, są one kolejnym przykładem, podkreślanej wcześniej, zróżnicowanej roli *PAI-1* w procesie progresji nowotworów. W ramach terapii genowej nowotworów stosowano także strategię antysensową w odniesieniu do składników układu aktywacji plazminogenu. Stosując antysensowe oligonukleotydy powodujące zahamowanie ekspresji genu *uPAR* osiągnięto całkowite zahamowanie inwazyjności fibroblastów prawidłowych i transformowanych wirusem SV40 [94]. W badaniach ludzkich epidermalnych komórek rakowych o wysokim stopniu złośliwości stwierdzono, że ich transfekcja rekombinacyjnym DNA zdolnym do ekspresji antysensowego transkryptu komplementarnego do 300 zasad na końcu 5' genu *uPAR*, włączając w to kodon ATG, powodowała znaczące zmniejszenie inwazyjności badanych komórek [95].

Pomimo przytoczonych pozytywnych efektów terapii skierowanej na układ aktywacji plazminogenu należy brać pod uwagę, że hamowanie aktywności wyłącznie tego układu może nie powodować zmniejszenia inwazyjności i metastazy nowotworów ze względu na możliwość uczestniczenia w tych procesach także innych układów enzymatycznych. Tezę tę potwierdzają rezultaty badań na myszach z zablokowanymi funkcjami genów *uPAR*, *uPAR* i *PAI-1*, które, pomimo pewnych zaburzeń fizjologicznych, zachowały podstawowe funkcje życiowe [92]. Może to świadczyć o tym, że inne układy proteaz, np. metaloproteazy, mogą przejmować funkcje nieaktywnych składników układu aktywacji plazminogenu.

VIII. Uwagi końcowe

Korelacja pomiędzy stężeniami uPA i uPAR oraz złym rokowaniem dla chorych na raka potwierdza założenie, że wiązanie uPA przez uPAR na powierzchni komórek rakowych sprzyja ich inwazji i metastazie. Jednak brak jest zgodności poglądów dotyczących identyfikacji typu komórek, w których następuje ekspresja uPA i uPAR w obszarach objętych nowotworem [92]. Rezultaty badań histochemicznych oraz wykonanych z zastosowaniem hybrydyzacji *in situ* pozwalają na przypuszczenie, że rola składników urokinazowego układu aktywacji plazminogenu w raku nie ogranicza się do udziału w migracji i inwazji komórek rakowych, lecz obejmuje również zmianę struktury tkanek otaczających nowotwór. Niektóre z tych zmian, np. angiogeneza, mogą mieć znaczenie dla procesu metastazy, wobec czego poziomy uPA i uPAR, biorących udział w tych procesach, mogą korelować ze złym rokowaniem. Możliwość stosowania inhibitora PAI-1 jako silnego markera prognostycznego w raku może być odniesiona do jego bezpośredniej roli w przemieszczaniu i inwazji komórek rakowych. Jednakże zróżnicowana ekspresja uPA i uPAR przez różne typy komórek w różnych obszarach tkanki przy jednoczesnej zróżnicowanej ekspresji PAI-1 może prowadzić do ukierunkowanej proteolizy, sprzyjającej inwazji. W takiej sytuacji PAI-1 odgrywałby rolę w przekształcaniu struktury tkanek przez selektywną ochronę fragmentów ECM w centralnych obszarach skupisk komórek rakowych i komórkach prawidłowych otaczających te obszary.

Jednym z głównych problemów dotyczących roli urokinazowego układu aktywacji plazminogenu, który powinien zostać rozwiązany w najbliższej przyszłości, jest precyzyjne określenie znaczenia PAI-1 w progresji nowotworów. Jedną z dróg prowadzących do osiągnięcia tego celu może być dokładniejsze określenie procesów zachodzących w nowotworach, w których biorą udział uPA, uPAR i PAI-1, z jednoczesnym określeniem relacji pomiędzy strukturą i funkcją poszczególnych białek. W badaniu procesów z udziałem uPA, jego receptora i inhibitora należałoby zwrócić uwagę także na efekty nie związane bezpośrednio z ich funkcjami proteolitycznymi, mogące mieć znaczenie w progresji nowotworów. Efekty te mogą obejmować oddziaływanie z białkami macierzy zewnątrzkomórkowej, receptorami adhezyjnymi czy cząsteczkami sygnałowymi.

Wśród genetycznych uwarunkowań funkcjonowania układu aktywacji plazminogenu w raku, istotne mogą być oddziaływania onkogenów i produktów ich ekspresji z genami *uPA*, *uPAR* i *PAI-1*. Oddziaływanie produktów onkogenów jako czynników transkrypcyjnych z genami układu może modulować transkrypcję, a tym samym ekspresję tych genów, wpływając na zmianę stężenia składników układu w nowotworach, którym towarzyszy aktywacja protoonkogenów. Po-

nieważ geny składników układu aktywacji plazminogenu są polimorficzne, regulacja ich ekspresji przez produkty onkogenów lub inne białka związane z transformacją nowotworową, może zależeć od wariantu oddziałującego genu. Stwarza to możliwość wykorzystania polimorfizmów genów składników układu jako łatwo dostępnych markerów prognostycznych w chorobach nowotworowych. Na szczególną uwagę, ze względu na swoje położenie, zasługuje polimorfizm insercyjno-delecyjny 4G/5G obszaru promotorowego genu *PAI-1*. Polimorfizm ten jest związany z podwyższonym poziomem PAI-1 obserwowanych w niektórych chorobach sercowo-naczyniowych.

Artykuł otrzymano 18 czerwca 1998 r.

Zaakceptowano do druku 26 października 1998 r.

Piśmiennictwo

1. Boyd D (1996) *Cancer Metastasis Rev* 15: 77-89
2. Shebert GV (1982) *The Biology of Tumor Malignancy*, Academic Press, London
3. Shebert GV (1987) *The Metastatic Spread of Cancer*, Macmillan, Basingstoke & London
4. Schmitt M, Harbeck N, Thomssen C, Wilhelm O, Magdolen V, Reuning U, Ulm K, Hjoeller H, Janicke F, Graeff H (1997) *Thromb Haemost* 78: 285-296
5. Liotta LA, Tryggvason K, Garbisa S, Hart I, Foltz CM, Shafie S (1980) *Nature* (Lond) 284: 67-68
6. Turpeenniemi-Hujanen T, Thorgeirsson UP, Hart IR, Grant SS, Liotta LA (1985) *J Natl Cancer Inst* 75: 99-103
7. Nakajima M, Welch DR, Belloni PN, Nicolson GL (1987) *Cancer Res* 47: 4869-4876
8. Lala PK, Graham CH (1990) *Cancer Metastasis Rev* 9: 369-379
9. Sloan BF (1990) *Semin Cancer Biol* 1: 137-152
10. Sloan BF, Moin K, Krepekela E, Rozhin J (1990) *Cancer Metastasis Rev* 9: 333-352
11. Benitez-Bribiesca L, Martinez G, Ruiz MT, Gutierrez-Delgado F, Utrera D (1995) *Arch Med Res* 26: 163-168
12. Mikkelsen T, Yan PS, Ho KL, Sameni M, Sloane BF, Rosenblum ML (1995) *J Neurosurg* 83: 285-290
13. Sinha AA, Gleason DF, Stanley NA, Wilson MJ, Sameli M, Sloane BF (1995) *Anat Rec* 241: 353-362
14. Morriset M, Capony F, Rochefort H (1986) *Biochem Biophys Res Commun* 138: 102-109
15. Rochefort H (1994) *Eur J Cancer* 30: 1583-1586
16. Scambia G, Panici PB, Ferrandina G, Di Stefano M, Romanini ME, Sica G, Mancuso S (1995) *Eur J Cancer* 31: 1449-1454
17. Dano K, Andreassen PA, Grondahl-Hansen J, Kristensen P, Nielsen LS, Skriver L (1985) *Adv Cancer Res* 44: 139-226
18. Blasi F, Vassali JD, Dano K (1987) *J Cell Biol* 104: 801-804
19. Matrisian LM (1990) *Trends Genet* 6: 121-125
20. Liotta LA, Steeg PS, Stetler-Stevenson WG (1991) *Cell* 64: 327-336
21. Mignatti P, Rifkin DB (1993) *Physiol Rev* 73: 161-195
22. Petersen LC, Lund LR, Nielsen LS, Dano K, Skriver L (1988) *J Biol Chem* 263: 11189-11195
23. Vassali J, Baccino D, Belin D (1985) *J Cell Biol* 100: 86-92
24. Roldan AL, Cubellis MV, Masucci M, Behrendt N, Lund LR, Dano K, Appella E, Blasi F (1990) *EMBO J* 9: 467-474
25. Dano K, Behrendt N, Brunner N, Ellis V, Ploug M, Pyke C (1994) *Fibrinolysis* 8: 189-203
26. Ellis V (1997) *Trends Cardiovasc Med* 7: 227-234

27. Andreasen PA, Georg B, Lund LR, Riccio A, Stacey SN (1990) *Mol Cell Endocrinol* **68**: 1-19
28. Cubellis MW, Wun TC, Blasi F (1990) *EMBO J* **9**: 1079-1085
29. Nykjaer A, Petersen CM, Moller B, Jensen PH, Moestrup SK, Holtet TL, Etzerodt M, Thogersen HC, Munch M, Andreasen P, Gliemann J (1992) *J Biol Chem* **267**: 14543-14546
30. Pyke C, Kristensen P, Ralfkiaer E (1991) *Am J Pathol* **138**: 1059-1067
31. Behrendt T, Ronne E, Dano K (1995) *Biol Chem Hoppe-Seyler* **372**: 269-279
32. Liotta LA, Goldfarb RH, Brundage R, Siegal GP, Terranova V, Garbisa S (1981) *Cancer Res* **41**: 4629-4636
33. Tripputi P, Blasi F, Verde P, Cannizzaro LA, Emanuel BS, Croce CM (1985) *Proc Natl Acad Sci USA* **82**: 4448-4452
34. Magdolen V, Rettenberger P, Koppitz M, Goretzki L, Kessler H, Weidle UH, Konig B, Graeff H, Schmitt M, Wilhelm O (1996) *Eur J Biochem* **237**: 743-751
35. Riccio A, Grimaldi G, Verde P, Sebastiano G, Boast S, Blasi F (1985) *Nucleic Acids Res* **13**: 2759-2771
36. Conne B, Berczy M, Belin D (1997) *Thromb Haemost* **77**: 434-435
37. Buo L, Lyberg T, Jorgensen L, Johansen HT, Aasen AO (1993) *APMIS* **101**: 235-241
38. Hachija T, Nakano H, Wake N, Sueishi R (1995) *Cancer J* **8**: 13-20
39. Plebani M, Herszenyi L, Cardin R, Roveroni G, Carraro P, Paoli MD, Rugge M, Grigioni WF, Nitti D, Naccarato R, Farinati F (1995) *Cancer Res* **76**: 367-375
40. Hsu DW, Efrid JT, Hedley-White ET (1995) *Am J Pathol* **147**: 114-123
41. Duffy MJ (1993) *Fibrinolysis* **7**: 295-302
42. Duffy MJ (1996) *Clin Cancer Res* **2**: 613-618
43. Grondahl-Hansen J, Christensen JJ, Rosenquist C, Brunner N, Mouridsen HT, Dano K, Blicherttoft M (1993) *Cancer Res* **55**: 1531-1539
44. Janicke F, Schmitt M, Pache L, Ulm K, Harbeck M, Hofler H, Graeff H (1993) *Breast Cancer Res Treat* **24**: 195-208
45. Grondahl-Hansen J, Hilsenbeck SG, Christensen JJ, Clark GM, Rosenquist C, Osborne CK, Brunner N (1997) *Breast Cancer Res Treat* **43**: 153-163
46. Pedersen H, Brunner N, Francis D, Osterlind K, Ronne E, Hansen HH, Dano K, Grondahl-Hansen J (1994) *Cancer Res* **54**: 4671-4675
47. Oka T, Ishida T, Nishino T, Sugimachi K (1991) *Cancer Res* **51**: 3522-3525
48. Hasui Y, Marutsuka K, Suzumiya J, Kitada S, Onda Y, Sumiyoshi A (1992) *Int J Cancer* **50**: 871-873
49. Mulcahy HE, Duffy MJ, Gibbons P, McCarthy P, Parfrey NA, O'Donoghue DP, Sheahan K (1994) *Lancet* **334**: 583-584
50. Kobayashi H, Gotoh J, Fujie M, Shinohara H, Moniwa N, Terao T (1994) *Int J Cancer* **57**: 727-733
51. Kuhn W, Pache L, Schmalfeldt B, Dettmar P, Schmitt M, Janicke F, Graeff H (1994) *Gynecol Oncol* **55**: 401-409
52. Hofmann R, Lehmer A, Buresch M, Hartung R, Ulm K (1996) *Cancer* **78**: 487-492
53. Bindahl AK, Hammoud M, Shi WM, Wu SZ, Sawaya R, Rao JS (1994) *J Neurooncol* **22**: 101-110
54. Achbarou A, Kaiser S, Tremblay G, Ste-Marie LG, Brodt P, Goltzman D, Rabbani SA (1994) *Cancer Res* **54**: 2372-2377
55. Choong PFM, Ferno M, Akerman M, Willen H, Langstrom E, Gustafson P, Alvegard T, Rydholm A (1996) *Int J Cancer* **69**: 268-272
56. Mackay AR, Corbitt RH, Hartzler JL, Thorngiersson U (1990) *Cancer Res* **50**: 5997-6001
57. Mars WM, Zarnegar R, Michalopoulos GK (1993) *Am J Pathol* **143**: 949-958
58. Hildenbrand R, Dilger I, Horlin A, Stutte JH (1995) *Pathol Res Pract* **191**: 403-409
59. Sprengers ED, Kluft C (1980) *Thromb Haemost* **69**: 381-387
60. Bosma PJ, Van den Berg EA, Koistra T, Siemieniack DR, Slightom L (1988) *J Biol Chem* **263**: 9129-9141
61. Henry M, Chomiki N, Scarabin PY, Alessi MC, Peiretti F, Arveiler D, Ferrieres J, Evans A, Amouyel P, Poirier O, Cambien F, Juhan-Vague I (1997) *Arterioscler Thromb Vascular Biol* **17**: 851-858
62. Nakanishi K, Kawai T, Torikata C, Aurues T, Ikeda T (1998) *Cancer* **82**: 724-732
63. Smolarz B, Blasiak J, Piestrzeniewicz D, Pytel J (1998) *Cell Mol Biol Lett* **3**: 49-56
64. Kobayashi H, Gotoh J, Fujie M, Shinohara H, Miniwa N, Terao T (1994) *Int J Cancer* **57**: 727-733
65. Hollas W, Blasi F, Boyd D (1991) *Cancer Res* **51**: 3690-3695
66. Nielsen LS, Kellerman GM, Behrendt N (1988) *J Biol Chem* **263**: 2358-2363
67. Ploug M, Ronne E, Behrendt N, Jensen AL, Blasi F, Dano K (1991) *J Biol Chem* **266**: 1926-1933
68. Fletcher CM, Harrison RA, Lachman PJ, Neuhaus D (1994) *Structure* **2**: 185-199
69. Ploug M, Ellis V (1994) *FEBS Lett* **349**: 163-168
70. Ploug M, Rahbek-Nielsen H, Ellis V, Roepstorff P, Dano K (1995) *Biochemistry* **34**: 12 524-12 534
71. Behrendt N, Ploug M, Patthy L, Houen G, Blasi F, Dano K (1991) *J Biol Chem* **266**: 7842-7847
72. Borglum AD, Byskov A, Ragno P, Roldan AL, Tripputi P, Cassani G, Dano K, Blasi F, Bolund L, Kruse TA (1992) *Am J Hum Genet* **50**: 492-497
73. Wang Y, Dang J, Johnson LK, Selhamer JJ, Doe WF (1995) *Eur J Biochem* **227**: 116-122
74. Kohonen-Corish MR, Wang Y, Doe WF (1996) *Human Genet* **97**: 124-125
75. Borglum AD, Byskov A, Cubellis MV, Kruse TA (1991) *Nucleic Acids Res* **19**: 6661
76. Pyke C, Graem N, Ralfkiaer E (1993) *Cancer Res* **53**: 1911-1915
77. Bianchi E, Cohen R, Thor AT, Todd RF, Mizukami IF, Lawrence DA, Ljung BM, Shuman MA, Smith HS (1994) *Cancer Res* **54**: 861-866
78. Pyke C, Eriksen J, Solberg H, Nielsen BS, Kristensen P, Lund LR, Dano K (1991) *FEBS Lett* **326**: 69-74
79. Ganesh S, Sier CFM, Heerding MH, Griffioen G, Lamers C, Verspaget HW (1994) *Lancet* **344**: 401-402
80. Duggan C, Maguire T, McDermott E, O'Higgins N, Fennelly JJ, Duffy MJ (1995) *Int J Cancer* **61**: 597-600
81. Grondahl-Hansen J, Peters HA, van Putten WLJ, Look MP, Pappot H, Ronne E, Dano K, Klijn JGH, Brunner N, Fockens JA (1995) *Clin Cancer Res* **1**: 1079-1087
82. Pedersen H, Grondahl-Hansen J, Francis D, Osterlind K, Hauser HH, Dano K, Brunner N (1994) *Cancer Res* **51**: 120-123
83. Heiss MM, Allgayer H, Gruetzner KU, Funke I, Babic R, Jauch KW, Schildberg FW (1995) *Nat Med* **1**: 1035-1038
84. Bessei D, Bardelli A, Didichenko S, Thelen M, Comoglio PM, Ponzetto C, Nagamine Y (1997) *Oncogene* **14**: 705-711
85. Arts J, Grimberger J, Bosma PJ, Rahmsdorf HJ, Kooistra T (1996) *Eur J Biochem* **241**: 393-402
86. Descheemacker KA, Wynn S, Nelles L, Auverx J, Ny T, Collen D (1992) *J Biol Chem* **267**: 49-56
87. Angel P, Imagawa M, Chiu R, Stein B, Imbra RJ, Rahmsdorf HJ, Jonat C, Herrlich P, Karin M (1987) *Cell* **49**: 729-739
88. Bosma P, Van der Berg EA, Kooistra T, Siemieniack DR, Slightom JL (1998) *J Biol Chem* **263**: 9129-9141
89. Lengye E, Singh B, Gum R, Nerlov C, Sabichi A, Birrer M, Boyd D (1995) *Oncogene* **11**: 2639-2648
90. Berney CR, Yang J, Fisher R, Russel P, Crowe (1998) *Oncol Res* **10**: 47-54
91. Min HY, Doyle LV, Vitt CR, Zandonella CI, Stratton-Thomas JR, Shuman MA, Rosenberg S (1996) *Cancer Res* **56**: 2428-2433
92. Andreasen PA, Kjoller L, Christensen L, Duffy

Rola reaktywnych form tlenu w procesach mutagenезy i karcynogenezy

Reactive oxygen species in mutagenesis and carcinogenesis

RYSZARD OLIŃSKI¹,
MAREK JURGOWIAK²

Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Wolne rodniki
 - II-1. Mechanizmy kontrolujące produkcję wolnych rodników (czynniki antyoksydacyjne)
- III. Oksydacyjne modyfikacje zasad azotowych
- IV. Mutagenny potencjał oksydacyjnie zmodyfikowanych zasad azotowych. Mutagenезa indukowana działaniem RFT w komórkach *Prokaryota* i *Eukaryota*
 - V. Znaczenie RFT w karcynogenezie
- VI. Znaczenie RFT jako regulatora proliferacji komórek i przekazywania sygnałów w komórce
- VII. Zakończenie

Contents:

- I. Introduction
- II. Free radicals
 - II-1. Endogenous antioxidant defences
- III. Oxidative DNA base defences
- IV. Mutagenicity of oxidative DNA base modifications. Reactive oxygen species as mutagens
 - V. Meaning of reactive oxygen species in carcinogenesis
- VI. Role of reactive oxygen species in cell proliferation and signal transduction
- VII. Conclusions

Wykaz stosowanych skrótów: WRT — wolne rodniki tlenowe; RFT — reaktywne formy tlenu; $O_2^{\cdot-}$ — anionorodnik ponadtlenkowy; $\cdot OH$ — rodnik hydroksylowy; HOCl — kwas podchloraowy; H_2O_2 — nadtlenuk wodoru; $NO\cdot$ — tlenek azotu; O_3 — ozon; SOD — dysmutaza ponadtlenkowa; GC/MS — chromatografia gazowa ze spektroskopią masową; A, T, G, C — literowe skróty oznaczają zasady azotowe: adenina, tymina, guanina, cytozyna; 8-okso-dGTP — 8-okso-2'-deoksyguanozyno-5'-trifosforan; dGTP — deoksyguanozyno-5'-trifosforan; 8-OH G — 8-hydroksyguanina (8-oksoguanina; 7, 8-dihydro-8-oksoguanina); Fapy G — 2,6-diamino-4-hydroksy-5-formamidopirymidyna; 5-OH-C — 5-hydroksycytozyna; 2-OH-A — 2-hydroksyadenina.

I. Wstęp

Organizm człowieka zbudowany jest z około 60 bilionów komórek, wśród których wyróżnić można 250 ich rodzajów, wchodzących w skład licznych typów tkanek, tworzących różne organy. Populację komórek, które tworzą organizm można opisać uży-

wając terminów ekologicznych: narodziny komórki, śmierć, środowisko życia, ograniczenia terytorialne, wielkość populacji. Jeden termin charakteryzujący każdą populację jest tu jednak nieobecny — tzn. naturalna selekcja. Jakakolwiek trwała zmiana, która umożliwiałaby komórce somatycznej zachowanie niezależne i anarchiczne w stosunku do potrzeb i prawideł struktury oraz funkcji narządów, niesie w sobie załączek katastrofy. Dochodzi do niej w przypadku choroby nowotworowej. Komórka staje się nowotworową z chwilą utraty kontroli nad procesami wzrostu i podziału, a zmiany prowadzące do transformacji nowotworowej mają charakter mutacji [1, 2].

Czynników indukujących nowotwory może być wiele (endogennych i egzogennych), a wśród nich wymienić należy czynniki fizyczne i chemiczne o działaniu mutagennym, prowadzące do powstania zmian w materiale genetycznym komórki. Do czynników tych zalicza się, między wieloma innymi, także wolne rodniki tlenowe (WRT).

Wolne rodniki, generowane w wyższych organizmach, powstawać mogą pod wpływem działania różnych czynników egzogennych, jak np. w wyniku

¹ Prof. dr hab., ² Dr, Katedra i Zakład Biochemii Klinicznej, Akademia Medyczna im. L. Rydygiera, ul. Karłowicza 24, 85-092 Bydgoszcz

jonizacji wody przez promienie X czy też działanie promieniowania UV, i endogennych np.: w mitochondrialnym łańcuchu oddechowym, podczas metabolizmu komórek stanów zapalnych tzn. neutrofilii, monocytów i eozynofili (przedłużające się stany zapalne są kojarzone z nowotworami) generujących oksydanty [3, 4]. Powstające w wyniku tego WRT tzn. $O_2^{\cdot-}$, $\cdot OH$ jak i nie będące rodnikami reaktywne formy tlenu (RFT), takie jak H_2O_2 (toksyczny ponieważ łatwo przekształcany jest w groźny rodnik hydroksylowy), uszkadzają makrocząsteczki komórkowe, a w tym DNA. Inne produkty tlenowego metabolizmu fagocytów np. HOCl, chloraminy i utlenione lipidy, indukują również uszkodzenia DNA. Metabolizm komórkowy różnych ksenobiotyków (np. benzopirenu) jest również odpowiedzialny za powstanie RFT. Dane te sugerują, że zarówno zewnątrz-, jak i wewnątrzkomórkowo generowane wolne rodniki lub/i stan pro-oksydacyjny może mieć istotne znaczenie w rozwoju różnych typów nowotworów [5, 6].

Od dawna wiadomo, że karcynogeneza jest procesem wieloetapowym. Najprostszy model zakłada obecność trzech etapów: inicjacji, promocji i progresji [7, 8]. Obecnie nikt już nie kwestionuje faktu, że uszkodzenia DNA (utrwalone w postaci mutacji) odgrywają kluczową rolę w każdym z tych etapów. Genetyczne podłoże procesu nowotworzenia, z jednej strony związane jest z czynnikami pobudzającymi wzrost (onkogeny i czynniki wzrostowe), a z drugiej strony z czynnikami hamującymi wzrost czyli genami supresorowymi (ang. *tumor suppressor genes*), lub z produktami genów mutatorowych. Produkty genów przeciwnowotworowych działają hamująco w procesach regulacji podziałów komórkowych i tym samym ograniczają proliferację komórek. Obecnie przyjmuje

Tabela 1.

Charakterystyka reaktywnych form tlenu (dane kompilowane z różnych wydawnictw a głównie wg Yu B.P., 1994 [51])

| Cząsteczka | Symbol | Charakterystyka |
|----------------------------|----------------|--|
| Anionorodnik ponadtlenkowy | $O_2^{\cdot-}$ | Dobry reduktant, słaby utleniacz |
| Rodnik hydroksylowy | $\cdot OH$ | Ekstremalnie reaktywny. Dyfunduje na niewielkie odległości. |
| Rodnik wodoronadtlenkowy | HO_2 | Silny oksydant, o większym powinowactwie do lipidów niż O_2 . Może inicjować peroksydację lipidów. |
| Rodnik nadtlenkowy | $ROO\cdot$ | Gorsza zdolność do utleniania niż $\cdot OH$ ale lepsza zdolność do dyfuzji. |
| Rodnik alkoksylo- | RO | Reaktywność z lipidami pośrednia pomiędzy ROO a $\cdot OH$. |
| Nadtlenek wodoru | H_2O_2 | Oksydant, lecz reakcje z substratami organicznymi powolne. Łatwo dyfunduje. |
| Tlen singletowy | 1O_2 | Silny czynnik oksydacyjny o okresie półtrwania $10^{-6}s$. |

się, że proces nowotworowy powstaje w skutek zakłócenia równowagi w działaniu tych czynników. Nadmierna aktywność czynników pobudzających na skutek nadprodukcji lub mutacji prowadzących do niekontrolowanego wzrostu przyczynia się do nowotworzenia, tak jak i niedobór produktów genów supresorowych lub ich mutacje są przyczyną zaniku ich funkcji prowadząc do karcynogenezy. Zgodnie z opinią, że nowotwór powstaje w wyniku nagromadzenia się zmian materiału genetycznego można założyć, że reprezentują one sukcesywnie następujące po sobie mutacje. Obliczenia wskazujące na 5-7 mutacji niezbędnych do transformacji komórki prawidłowej w pełni ukształtowaną komórkę nowotworową zgadzają się z obserwowaną zależnością ilości zachorowań od wieku pacjenta. Można przyjąć, że potencjalnym karcynogenem jest każdy czynnik reagujący z DNA i w następstwie modyfikujący tę makrocząsteczkę. Znaczący wkład w powstanie takich zmian mogą zatem mieć uszkodzenia DNA indukowane wolnymi rodnikami.

II. Wolne rodniki

Określenie reaktywne formy tlenu (RFT) obejmuje, zarówno rodniki tlenowe, jak i nie będące rodnikami pochodne tlenu, takie jak: H_2O_2 , tlen singletowy, HOCl czy ozon O_3 . Natomiast cząsteczki lub atomy znane jako wolne rodniki, są wysoce reaktywnymi czynnikami, posiadającymi niesparowany elektron na orbicie zewnętrznej (obecność takiego elektronu oznacza się kropką przy symbolu rodnika). Przykładem rodników tlenowych mogą być: anionorodnik ponadtlenkowy $O_2^{\cdot-}$, rodnik hydroksylowy $\cdot OH$, tlenek azotu $NO\cdot$ (Tab. 1). Każda komórka aerobowa wytwarza w przebiegu metabolizmu pewne ilości RFT [3, 4]. Przyjmuje się, że w zdrowym organizmie dorosłego człowieka powstawać może około 2 kg anionorodnika ponadtlenkowego w przeciągu roku. W środowisku komórkowym przemiany anionorodnika ponadtlenkowego mogą prowadzić do powstania H_2O_2 , zarówno na skutek spontanicznej jak i katalizowanej przez enzym dysmutazę ponadtlenkową (SOD) reakcji dysmutacji. Nadtlenek wodoru w warunkach *in vivo* powstaje prawdopodobnie głównie z $O_2^{\cdot-}$ w mitochondriach wielu komórek. H_2O_2 , który nie jest wolnym rodnikiem, łatwo przenika przez błony komórkowe i przekształcany może być w formę wolnorodnikową. Cząsteczką tą jest rodnik hydroksylowy który powstaje w komórkach według reakcji Fentona z udziałem jonów żelazawych Fe^{+2} bądź Cu^{+1} i Co^{+2} . Ten dość złożony proces można ostatecznie przedstawić jako reakcję: $O_2^{\cdot-} + H_2O_2 \rightarrow \cdot OH + OH^- + O_2$. Obecność $O_2^{\cdot-}$ w komórce może prowadzić zatem do generowania o wiele bardziej niebezpiecznego dla komórki rodnika $\cdot OH$.

Wiele egzogennych czynników przenikając do komórek i reagując z endogennym H_2O_2 może powodo-

wać powstawanie rodników hydroksylowych. Należą do nich metale ciężkie, takie jak chrom i nikiel. Źródłem rodników jest także dym powstający podczas palenia tytoniu. Substancje smoliste znajdujące się w jednym wdechu dymu tytoniowego zawierają aż 10^{14} rodników, z których większość jest bardzo stabilna. W dymie papierosowym obecny jest również w wysokim stężeniu tlenek i dwutlenek azotu. Dym papierosowy zwiększa liczbę granulocytów obojętnochłonnych w płucach, stymulując je do wytwarzania $O_2^{\cdot-}$ i H_2O_2 . Zwiększa się ponadto liczba zaktywowanych makrofagów w płucach, które też wydzielają $O_2^{\cdot-}$ i H_2O_2 . W substancji smolistej zawartej w dymie tytoniowym znajdują się związki o charakterze aromatycznym oraz stabilne wolne rodniki semichinonowe w formie polimerów [3]. Natomiast w ekstrakcie wodnym substancji smolistej stwierdzono obecność $O_2^{\cdot-}$ i nadtlenków. Zarówno dym tytoniowy jak i ekstrakt wodny substancji smolistej powodują uszkodzenia DNA w warunkach *in vivo* i *in vitro*.

III-1. Mechanizmy kontrolujące produkcję wolnych rodników (czynniki antyoksydacyjne)

Paradoksalnym wydaje się fakt, że aerobowe organizmy eukariotyczne mogą żyć tylko w obecności tlenu, który jednocześnie jest dla nich toksyczny i prawdopodobnie może być czynnikiem ograniczającym (terminacyjnym) czas życia tych organizmów. Drugie, mroczne oblicze tlenu, to wszechobecne, reaktywne jego formy (RFT). W trakcie ewolucji organizmy wykształciły cały szereg mechanizmów ograniczających destrukcyjne działanie RFT, w tym szczególnie ich form wolnorodnikowych. Dokładniejsze dane dotyczące czynników antyoksydacyjnych, czy też szerzej różnych mechanizmów chroniących organizmy przed działaniem RFT, znajdzie czytelnik w licznych pracach przeglądowych [3, 4, 9, 10].

Ponieważ poziom RFT jest zmienny w czasie, organizmy tlenowe mogą adaptować się do takich zmiennych warunków indukując syntezę enzymów antyoksydacyjnych lub/i enzymów naprawiających oksydacyjne uszkodzenia biologicznie ważnych makromolekuł, w tym DNA [11-13]. Pomimo obecności całego szeregu barier antyoksydacyjnych, w tym mechanizmów naprawczych, uszkodzenia struktur komórkowych spowodowane generowaniem wolnych rodników tlenowych są nieuniknioną konsekwencją życia w atmosferze tlenowej.

III. Oksydacyjne modyfikacje zasad azotowych

Z powodu olbrzymiej reaktywności WRT mogą oddziaływać praktycznie z każdą napotkaną makrocząsteczką, a zatem, mogą modyfikować białka, lipidy, węglowodany i kwasy nukleinowe. Szczególnie duże zagrożenie dla organizmu niosą z sobą reakcje WRT

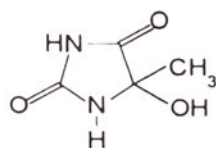
z DNA. Reagując z DNA wolne rodniki mogą powodować jedno- i dwuniciowe pęknięcia DNA (ss i ds) i różnego rodzaju modyfikacje zasad azotowych. Niektóre spośród oksydacyjnych modyfikacji zasad azotowych mają znaczenie mutagenne. Do chwili obecnej zidentyfikowano ponad 20 różnego rodzaju oksydacyjnych modyfikacji zasad azotowych, ale biologiczna rola niektórych spośród nich nie jest dostatecznie poznana. (Ryc. 1) Znanym i akceptowanym jest fakt występowania pewnej ilości oksydacyjnych modyfikacji DNA w prawidłowej komórce (w dalszym ciągu nie wiadomo jednak, jakiego rzędu są to wielkości).

A m e s i G o l d wyliczyli, że w pojedynczej komórce szczura znajduje się 10^5 oksydacyjnych uszkodzeń DNA. Analizując zawartość 8-okso-dG w moczu, L o f t i w s p. [14], doszli do wniosku, że w pojedynczej komórce człowieka może powstawać kilkaset uszkodzeń typu 8-okso-G/dzień. Według innych danych 8okso-dG wytwarzana jest w ilości 178 cząsteczek na komórkę każdego dnia [15].

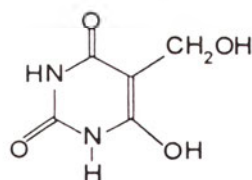
IV. Mutageny potencjał oksydacyjnie zmodyfikowanych zasad azotowych. Mutageneza indukowana działaniem RFT w komórkach *Prokaryota* i *Eukaryota*

8-oksoguanina jest jednym z najczęściej powstających i najgruntowniej przebadanych, produktów modyfikacji zasad DNA przez reaktywne formy tlenu. 8-okso-G może tworzyć stabilne pary zasad, zarówno z cytozyną jak i adeniną [16]. W tym ostatnim przypadku może to prowadzić do transwersji GC \rightarrow TA [17, 18, 19]. W badaniach *in vivo* wykazano, że obecność 8-okso-dG w DNA jest odpowiedzialna za 0,7% częstość zamiany guaniny w tyminę podczas procesu replikacji [17]. Okazało się, że produkt oksydacyjnej modyfikacji dGTP, 8-okso-dGTP jest dobrym substratem polimeraz DNA. Inkorporacja 8-okso-dGTP do DNA jest źródłem dodatkowych mutacji (omówienie tego problemu znajdzie czytelnik w artykule przeglądowym) [20].

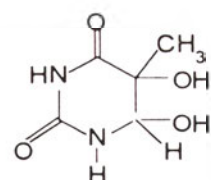
Mutageny potencjał zmodyfikowanych zasad azotowych powinien znajdować odbicie w możliwości tworzenia błędnych par zasad przez taką modyfikację. Wyniki eksperymentów prowadzonych w wielu laboratoriach w ciągu ostatnich lat wykazały, że również inne, niż 8-oksoguanina modyfikacje zasad azotowych, wykazują takie właściwości. Przyjmuje się, że obecność 8-oksoadeniny w DNA może prowadzić do transwersji A \rightarrow C i tranzycji A \rightarrow G [21] w genach c-Ha-ras (Tab. 2). Jednak badania *in vitro* z użyciem różnych polimeraz DNA (fragmentu Klenowa-polimerazy I, polimerazy alfa i beta) jak również wyniki doświadczeń wykorzystujących komórki *E. coli* wskazują na znacznie słabsze (około rząd wielkości) właściwości mutagenne tak zmodyfikowanej adeniny aniżeli 8-oksoguaniny [22]. 2-OH-adenina może tworzyć pary zasad nie



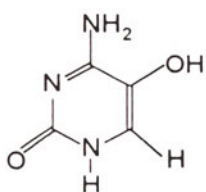
5 - hydroksy - 5 - metylohydantoina



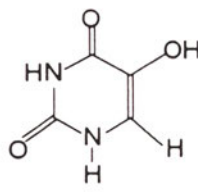
5 - hydroksymetylouracyl



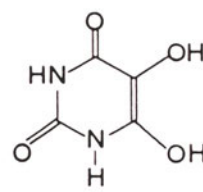
glikol tyminowy



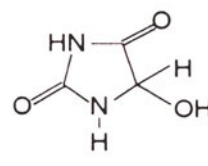
5 - hydroksycytozyna



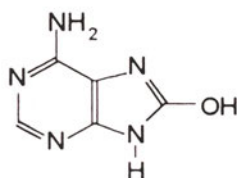
5 - hydroksyuracyl



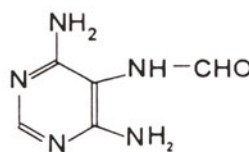
5, 6 - dihydroksyuracyl



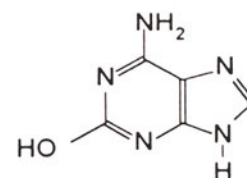
5 - hydroksyhydantoina



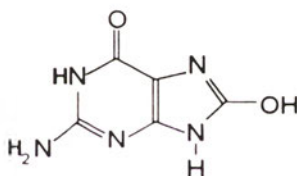
8 - hydroksyadenina



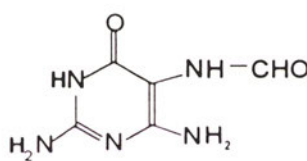
4, 6 - diamino -5- formamidopirymidyna (Fapy adenina)



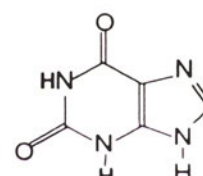
2 - hydroksyadenina



8 - hydroksyguanina



2, 6 - diamino -4- hydroksy -5- formamido-pirymidyna (Fapy guanina)



ksantyna

Ryc. 1. Zmodyfikowane formy zasad azotowych, będące wynikiem oddziaływania z rodnikiem $\cdot\text{OH}$.

tylko z tyminą, ale również z guaniną, adeniną i cytozyną, co indukuje transwersje $A \rightarrow T$ i $A \rightarrow C$ i tranzycje $A \rightarrow G$ [21, 23]. Wykazano również, że 2-OH-dATP jest włączany naprzeciw tyminy lub cytozyny przez polimerazę alfa [17, 21]. Może to prowadzić do tranzycji $CG \rightarrow TA$, a więc zmian najbardziej typowych dla mutacji spontanicznych [24]. Transfekcja

Tabela 2.

Spektrum mutacji indukowanych obecnością oksydacyjnie zmodyfikowanych zasad azotowych w DNA (kompilacja różnych danych literaturowych — zmienione).

| Nazwa zmodyfikowanej zasady | Charakter substytucji | Wynik inkorporacji zmodyfikowanej zasady do nici DNA (nowo syntetyzowanego) |
|-----------------------------|--|---|
| 8-OH-guanina | $G \rightarrow T$ | $AT \rightarrow CG$, $GC \rightarrow TA$ |
| 8-OH-adenina | $A \rightarrow G$ | $CG \rightarrow TA$ |
| 2-OH-adenina | $A \rightarrow T$, $A \rightarrow C$ | |
| 5-OH-cytozyna | $A \rightarrow G$ $C \rightarrow T$, $C \rightarrow G$ | |

wektora zawierającego 2-OH-A do komórek *E. coli* wykazała, że częstość mutacji indukowanych obecnością 2-OH-A (potencjał mutageny) jest podobna do wartości zaobserwowanych dla 8-okso-G i wynosi 0,3-0,8% [24].

Głównymi produktami reakcji cytozyny z rodnikiem $\cdot\text{OH}$, są 5-OH-cytozyna i 5-OH-uracyl. Okazało się, że również takie modyfikacje mają właściwości mutagenne. Obecność 5-OH pochodnych cytozyny w DNA może prowadzić do tranzycji $C \rightarrow T$ i transwersji $C \rightarrow G$ [25]. Wprowadzenie fragmentu DNA zawierającego 5-OH-C do komórek *E. coli* było, jak wykazano, odpowiedzialne za wystąpienie substytucji $C \rightarrow T$ z częstością 2,5% [26]. 5-OH-dCTP jest substratem dla fragmentu Klenowa polimerazy I i może tworzyć pary zasad, zarówno z G jak i z A [25]. 5-OH-cytozyna może więc mieć największe znaczenie w procesie mutagenyzy indukowanej wolnymi rodnikami tlenowymi.

Wyniki niektórych doświadczeń sugerują, że obecność Fapy G może prowadzić do transwersji $GC \rightarrow CG$ [27]. Generalnie przyjmuje się jednak, że zarówno obie

formamidopirymidyny, jak i glikol tyminy, blokują proces replikacji DNA [28].

W celu określenia spektrum mutacji indukowanych przez RFT wykorzystano jednoniciowy kołowy DNA M13 mp2 zawierający gen reporterowy *lacZ* [29]. Po ekspozycji na RFT DNA ulegał replikacji *in vivo* w komórkach *E. coli* lub *in vitro* przy udziale różnych polimeraz DNA. Wykorzystanie jednoniciowej matrycy umożliwiło proste wyznaczenie korelacji między modyfikacją wytworzoną przez RFT w określonym miejscu i mutacją, która powstaje w wyniku replikacji zmienionego miejsca. Zastosowanie takiego modelu pozwoliło na stwierdzenie, że najczęstszym typem zmian indukowanych RFT, które w wyniku replikacji w komórce *E. coli* mogą zapoczątkować mutacje są tranzycje C→T i transwersje G→T i G→C, oraz podwójne, tandemowe tranzycje CC→TT. Należy pamiętać o tym, że trudno jest bezpośrednio ekstrapolować otrzymane w opisanych badaniach wyniki na komórki ludzkie. Po pierwsze, zaobserwowane mutacje dotyczyły miejsc, które nie zostały zreperowane w komórkach bakteryjnych. W komórkach ludzkich rozpoznawanie i naprawa takich modyfikacji może podlegać odmiennym regułom [29]. Co więcej, zaobserwowane mutacje zależą od indukcji bakteryjnego systemu SOS i od właściwości bakteryjnego aparatu replikacyjnego.

Wyniki badań z użyciem eukariotycznych polimeraz (polimerazy alfa i beta) wykazały, że uszkodzenia DNA indukowane RFT mogą być źródłem innego spektrum mutacji, niż te obserwowane w komórkach bakteryjnych. Najbardziej intrygujące było stwierdzenie, że ten sam typ uszkodzenia może być źródłem innego rodzaju zmian mutacyjnych w zależności od rodzaju użytej polimerazy. Na przykład w wyniku modyfikacji cytozyny dochodzi do różnych substytucji, jeżeli matryca ulega replikacji przez polimerazę beta. Natomiast wykorzystanie polimerazy alfa do kopiowania tej samej matrycy prowadzi do powstania wyłącznie transwersji C→A. Zatem, polimeraza beta jest mniej specyficzna w rozpoznawaniu uszkodzonych cząsteczek cytozyny. Co więcej, niektóre konkretne uszkodzenia, lub sąsiedztwo określonych zasad w obrębie uszkodzenia mogą decydować o tym, że modyfikacja może być źródłem mutacji tylko dla jednej z polimeraz. Polimerazy DNA pełnią więc ważną rolę w określaniu, zarówno miejsca, jak i typu mutacji jaka może być wynikiem działania RFT na DNA [29]. Zdecydowana większość oksydacyjnych zmian DNA o charakterze promutagennym usytuowana jest w tych częściach genomu, które pozostają bez wpływu na podstawowe funkcje komórki. Bardzo niewielka część tych uszkodzeń może występować w obrębie komórkowych onkogenów, bądź genów supresorowych, co z kolei, mogłoby zapoczątkować transformację nowotworową i niekontrolowaną proliferację komórki, zawierającej takie mutacje.

Dane eksperymentalne potwierdzają, że rodniki tlenowe indukują mutację w „gorących miejscach”

antyonkogenu p53. Kodon 248 tego genu (CGG) jest miejscem, które najczęściej ulega mutacjom w przypadku kilku ludzkich nowotworów [30]. Okazało się, że stres oksydacyjny indukowany działaniem H₂O₂/FeCl₃ na ludzkie fibroblasty jest odpowiedzialny za transwersje G→C w drugiej pozycji i tranzycje G→A w pozycji trzeciej. Nie wyjaśniono, jaka modyfikacja G prowadzi do takich zmian. Natomiast spektrum mutacji w kodonach 249 (AGG) i 250 (CCC) zdominowane jest transwersjami G→T i C→G, zmianami typowymi dla obecności 8-oxo-G i 5-OH-C.

W przypadku onkogenu *ras* jednym z kodonów, najczęściej ulegającym mutacjom, jest kodon 12 (GGC), w którym guanina ulega transwersji do tyminy. Włączenie do wektora plazmidowego części onkogenu zawierającej, w miejscu G1 lub G2 kodonu 12, 8-Oxo-G prowadziło do transwersji G→T [31].

W zgodzie z tymi obserwacjami pozostaje fakt, że transwersje GC→TA, typowe dla błędnego parowania 8-oxo-dG, są bardzo często przyczyną mutacji anty-onkogenu p53 komórek raka płuc i protoonkogenu *ras* w przypadku raka wątroby człowieka. Należy też podkreślić, że ten sam typ zmian jest typowy dla adduktów DNA z benzopirenem i aflatoksyną B1 [30].

V. Znaczenie RFT w karcynogenezie

Warto zwrócić uwagę na dwa typy nowotworów człowieka, których charakterystyka wskazuje na udział wolnych rodników tlenowych w procesie karcynogenezy. W obu przypadkach progresja zmian komórkowych, prowadzących do uzłośliwienia komórki zachodzi w przeciągu długiego okresu czasu, nierzadko rozciągającego się na dziesięciolecia co sugeruje akumulację wielorakich mutacji.

Rak płuc jest jedną z najczęściej występujących form nowotworów, zarówno u kobiet, jak i mężczyzn. Wiadomo obecnie, że 90% przypadków raka płuc powiązanych jest z paleniem tytoniu [32, 33]. Zaobserwowany fakt pozwolił na stosunkowo precyzyjne ustalenie przedziału czasowego, jaki upływa od chwili ekspozycji na czynnik karcynogeny do momentu pojawienia się w pełni uformowanego guza. Dla większości przypadków jest to okres około trzydziestu lat. Wiadomo też, że niezbędna jest stała ekspozycja na czynnik(i) karcynogeny(e), ponieważ, jak wykazano, rezygnacja z nałogu palenia tytoniu znacznie zmniejsza ryzyko wystąpienia choroby. Przypuszczalnie pod wpływem dymu tytoniowego (zawartych w nim składników) zachodzi cała seria zmian niezbędnych do transformacji nowotworowej komórki. Jednym z rodzajów takich zmian mogą być oksydacyjne uszkodzenia komórkowego DNA, indukowane wolnymi rodnikami tlenowymi. Nie jest to hipoteza pozbawiona podstaw eksperymentalnych [34]. Rezultatem ekspozycji kultur komórkowych na dym tytoniowy jest akumulacja 8-OH-guaniny, a w moczu palaczy tytoniu zaobserwowano znacznie podwyższony poziom zmo-

dyfikowanych działaniem wolnych rodników tlenowych, zasad azotowych.

Rak prostaty jest częstą chorobą wieku podeszłego u mężczyzn [35], chociaż typowe postacie rozrostów prostaty dosyć często spotyka się u mężczyzn w wieku 50 lat. Niewykluczone, że w skład hipertroficznymi ognisk mogą wchodzić komórki ze zmianami przednowotworowymi. Sytuacja może przypominać wielostopniowy model formowania raka jelita grubego, gdzie w stadium przednowotworowym występują hipertroficzne polipy. Ponieważ rak prostaty występuje najczęściej u mężczyzn w wieku 70-80 lat, można wnioskować, że zmiany prowadzące do rozwoju tej jednostki chorobowej akumulują się w przeciągu 30-40 lat. Nieznane są jakiegokolwiek związki chemiczne, których obecność mogłaby być powiązana z ryzykiem wystąpienia raka prostaty, brak jest również jakiegokolwiek znanych środowiskowych, czy związanych z pracą zawodową, czynników ryzyka. Wszystkie przedstawione dane sugerują, że formowanie się raka prostaty powiązane jest z endogennymi procesami komórkowymi, a RFT są najbardziej prawdopodobnymi czynnikami odpowiedzialnymi za karcynogenezę.

Na niebagatelną rolę, jaką mogą pełnić oksydacyjne zmodyfikowane zasady azotowe w procesie karcynogenezy u człowieka, wskazują wyniki badań, w których wykazano znacznie podwyższoną zawartość tych uszkodzeń w tkankach nowotworowych w porównaniu z tkankami wolnymi od zmian nowotworowych [36]. Stosując technikę chromatografii gazowej ze spektroskopią masową GC/MS, badano poziom typowych, dla reakcji wolnorodnikowych z DNA, modyfikacji zasad azotowych w chromatynie izolowanej z różnych tkanek nowotworowych człowieka i z odpowiadających im obrzeży, z punktu widzenia histopatologicznego, wolnych od zmian nowotworowych. We wszystkich badanych przypadkach stwierdzony został podwyższony poziom produktów reakcji wolnych rodników z DNA w tkankach nowotworowych w porównaniu z tkanką kontrolną. Ilość modyfikacji zależała od rodzaju tkanki nowotworowej i typu modyfikacji. W tkance płucnej uzyskanej od palaczy stwierdzono najwyższe wartości zmodyfikowanych zasad. Również w nowotworach żołądka, jajników i mózgu wykryto statystycznie istotne zmiany zawartości oksydacyjnych uszkodzeń DNA w porównaniu z odpowiadającymi im obrzeżami [36].

Podwyższony poziom zmodyfikowanych zasad w tkankach nowotworowych może być częściowo wynikiem obecności w guzach dużej ilości leukocytów. Aktywowane leukocyty są źródłem H_2O_2 , który może penetrować błonę komórkową i otoczkę jądrową, i w jądrze powodować specyficzne uszkodzenia DNA wynikające z wytwarzania rodnika $\cdot OH$ w reakcji z metalami związanymi z DNA. Z przeprowadzonych badań wynika, że ekspozycja ludzkich komórek na aktywowane estrami forbolowymi leukocyty indukuje w DNA izolowanym z tych komórek zmiany charak-

teryistyczne dla ataku rodnika $\cdot OH$ [37].

Innym powodem wzrostu zawartości zmodyfikowanych zasad azotowych w DNA guzów nowotworowych może być produkcja znacznej ilości H_2O_2 przez komórki transformowane [38]. Co więcej, z licznych danych doświadczalnych wynika, że komórki nowotworowe mają znacznie obniżoną aktywność i poziom niektórych enzymów antyoksydacyjnych, w porównaniu z komórkami prawidłowymi [34, 39-41]. Niski poziom SOD i katalazy może prowadzić do stresu oksydacyjnego, którego wynikiem mogą być uszkodzenia DNA w komórkach nowotworowych.

W celu wykazania zależności pomiędzy oksydacyjnymi uszkodzeniami DNA a aktywnością enzymów antyoksydacyjnych w tkankach nowotworowych i w tkankach wolnych od zmian nowotworowych, badano poziom zmodyfikowanych zasad oraz aktywność SOD, katalazy i peroksydazy glutationowej w prawidłowych i zmienionych nowotworowo tkankach płuc człowieka [34]. W zgodzie z powyżej opisanymi badaniami stwierdzono wyższy poziom uszkodzeń DNA w tkankach nowotworowych w porównaniu z obrzeżami wolnymi od zmian nowotworowych. Najbardziej wyraźne zmiany dotyczyły 8-OH-G i 8-OH-A. Aktywność enzymów antyoksydacyjnych była niższa w tkance nowotworowej w porównaniu do tkanek prawidłowych [34]. Podobne zmiany stwierdzono w tkankach stercza pochodzących od pacjentów z BPH (łagodny rozrost prostaty, BPH ang. *benign prostatic hyperplasia*), jednak tylko u części z badanych pacjentów [39].

Do końca jednakże nie wiadomo, czy zaobserwowane podczas badań zjawiska są bezpośrednią przyczyną procesu nowotworzenia, czy też są raczej skutkiem toczących się procesów chorobowych. Warto jednak pamiętać, że podobne zmiany zmodyfikowanych zasad azotowych wyprzedzają formowanie nowotworu w organach docelowych, w przypadku karcynogenezy indukowanej związkami generującymi RFT. Do tego typu związków należą pochodne niklu, które po podaniu szczurom indukują raka nerki. W 24 godziny po podaniu octanu niklu obserwowano wzrost zawartości oksydacyjnie zmodyfikowanych zasad azotowych w DNA izolowanych zarówno z nerki jak i wątroby szczura. Dwa tygodnie później zawartość tych uszkodzeń wracała do poziomu kontrolnego w przypadku wątroby, podczas gdy w nerce poziom niektórych modyfikacji (np 8-oxo-G) jest niezmiennie wysoki [42]. Możliwe, że utrzymujący się przez długi okres czasu podwyższony poziom mutagennej modyfikacji DNA może odpowiadać za indukcję raka nerki.

Należy również podkreślić, że w pełni rozwiniętej komórce nowotworowej wzrost zawartości zmodyfikowanych zasad azotowych może przyczynić się do wzrostu niestabilności genetycznej i wzrostu potencjału metastatycznego — (wzrostu możliwości tworzenia przerzutów). Sugestia ta została ostatnio potwierdzona przez *M a l i n s a i H a i m a n o t* [43], którzy

wykazali, że w przypadku ludzkich raków piersi potencjał metastatyczny (przerzutowania) wzrastał wraz ze wzrostem liczby oksydacyjnych uszkodzeń DNA.

Niemalże wszystkie środki stosowane w terapii przeciwnowotworowej mają właściwości wtórnych karcynogenów. Niektóre z tych środków generują wolne rodniki tlenowe. Najbardziej typowym przykładem jest promieniowanie jonizujące, ale niektóre spośród związków używanych w chemioterapii, takie jak np. pochodne adriamycyny, są również odpowiedzialne za akumulację RFT. Z przeprowadzonych analiz wynika, że dożylnie podanie epirubicyny (pochodna adriamycyny) jest odpowiedzialne za znaczne podwyższenie poziomu oksydacyjnie zmodyfikowanych zasad azotowych w DNA izolowanym z limfocytów krwi pacjentów pobranej po upływie godziny od infuzji leku [44]. Zdecydowana większość tych uszkodzeń jest usuwana z DNA przez komórkowe systemy naprawcze, ponieważ 24 godziny po podaniu leku w zdecydowanej większości przypadków zawartość zmodyfikowanych zasad wracała do poziomu obserwowanego w materiale kontrolnym. U niektórych pacjentów poziom tych uszkodzeń pozostaje jednak podwyższony. Przyjmuje się, że nienaprawione uszkodzenia DNA długożyjących limfocytów B mogą prowadzić do nowotworzenia [45]. Niepodlegające naprawie oksydacyjne modyfikacje zasad azotowych o charakterze mutagennym, takie jak 8-okso-G, czy 5-OH-C lub 2-OH-A mogą być zatem źródłem wtórnej karcynogenezy i w przypadkach opisanych powyżej prowadzić do powstania białaczek.

VI. Znaczenie RFT jako regulatora proliferacji komórek i przekazywania sygnałów w komórce

U człowieka, w wieku dojrzałym, różne typy komórek charakteryzują się określoną liczbą podziałów. Na przykład, komórki macierzyste krwi i skóry dzielą się w odstępie kilku godzin czy dni, podczas gdy komórki nerwowe tracą bezpowrotnie zdolność do podziałów we wczesnym okresie życia człowieka. Komórki nie proliferujące znajdują się w fazie G_0 , jednak niektóre z nich (limfocyty) mogą pod wpływem różnych czynników mitotycznych ponownie wchodzić w cykl komórkowy. Natomiast niekontrolowany wzrost, nawet pojedynczej komórki, może prowadzić do rozwoju nowotworu. Zatem, istotne wydaje się zrozumienie mechanizmów działania czynników określanych jako regulatory wzrostu i różnicowania komórek w warunkach fizjologicznych i stanach patologicznych komórki.

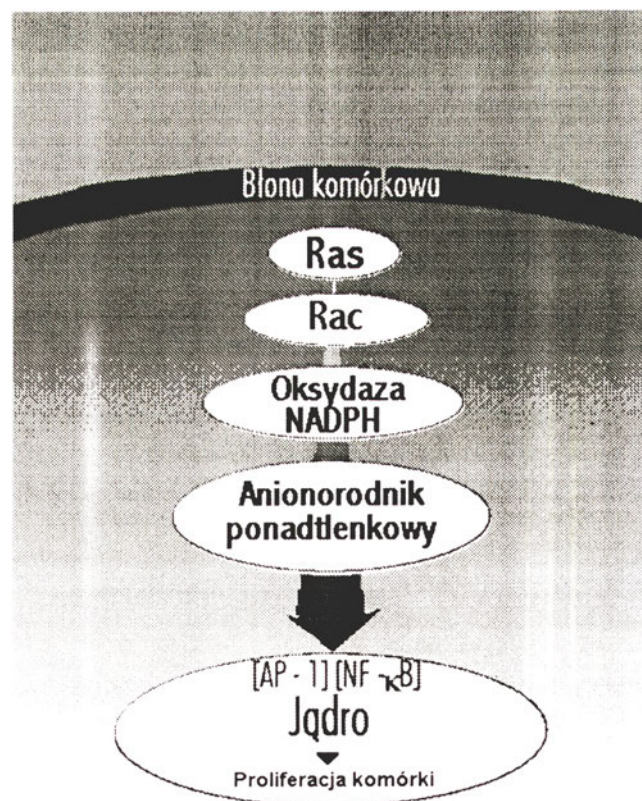
Wolne rodniki tlenowe mogą być uważane za kompletne karcynogeny ponieważ mają znaczenie mutagenne, jak i mogą stymulować podziały komórkowe [46] (Ryc. 2).

Od dawna przypuszczano, że RFT mogą odgrywać znaczącą rolę w przekazywaniu sygnałów komórko-

wych. Okazuje się, że komórki z uaktywnionym protoonkogenem *ras* wytwarzają znacznie więcej anionorodnika ponadtlenkowego aniżeli komórki kontrolne. Co więcej, jak wykazano, wynikiem inaktywacji białka p21 (produktu onkogenu) jest spadek stężenia anionorodnika ponadtlenkowego. Ciekawy jest mechanizm prowadzący do zależnego od onkogenu *ras* wytwarzania anionorodnika. Okazało się, że produkcja $O_2^{\cdot-}$ jest niezależna od łańcucha oddechowego zlokalizowanego w mitochondriach. Zależy natomiast od oksydazy NADPH, enzymu wykorzystywanego przez fagocyty do produkcji RFT. Nieznany jest, jak do tej pory, mechanizm, który wyjaśniałby związek przyczynowo-skutkowy między wzmożoną produkcją RFT i sygnałem decydującym o rozpoczęciu syntezy DNA. Możliwe, że RFT działając jako aktywatory procesu transkrypcji (czynniki transkrypcyjne aktywowane mogą być pod wpływem szoku tlenowego) wpływają również na regulację cyklu komórkowego [47]. Powyższe dane uzupełniają także doniesienia poparte obserwacjami, że PDGF, wzmagając powstawanie nadtlenu wodoru, wyzwała proliferację komórek mięśni gładkich naczyń [48].

VII. Zakończenie

Dodatkowych argumentów przemawiających za udziałem RFT w procesie karcynogenezy dostarczają



Ryc. 2. Komórki z uaktywnionym protoonkogenem *ras* wytwarzają dużą ilość anionorodnika ponadtlenkowego. Produkcja $O_2^{\cdot-}$ — zależna jest od oksydazy NADPH. Rodniki tlenowe działając jako aktywatory transkrypcji (czynniki transkrypcyjne aktywowane mogą być pod wpływem szoku tlenowego) wpływają na regulację cyklu komórkowego (na podstawie [46] — zmodyfikowane).

dane epidemiologiczne [49]. Z danych tych wynika, że:
 — około 1/3 wszystkich przypadków nowotworów człowieka związana jest z paleniem tytoniu,
 — 1/3 zawdzięczamy niewłaściwej diecie,
 — pozostała 1/3 wszystkim pozostałym czynnikom, takim jak czynniki karcynogenne powiązane z wykonywaniem zawodu, czynniki środowiskowe, wirusy onkogenne, promieniowanie UV i jonizujące.

O udziale RFT w wymienionych pierwszej i trzeciej grupie czynników ryzyka traktuje powyższy tekst. Okazuje się również, że niewłaściwa dieta może być źródłem RFT. Na przykład przygotowanie potraw w obecności olei związane jest z generowaniem nadtlentków lipidowych. W przeprowadzonych na materiale zwierzęcym eksperymentach wykazano również związek między nadmiarem kalorii a procesami prowadzącymi do nowotworzenia. Restrykcja kaloryczna jest natomiast czynnikiem zapobiegającym rozwojowi zmian będących przyczyną karcynogenezy. Ponieważ bezsporna jest korelacja między ilością kalorii w diecie a tempem metabolizmu tlenowego, to niewykluczone jest, że bogatokaloryczna dieta odpowiedzialna jest za generowanie nadmiernych ilości RFT. Wiadomym jest również, że witaminy o właściwościach antyoksydacyjnych zapobiegają w pewnym stopniu karcynogenezie. Nowotwory są jedną z chorób wieku podeszłego. Nie wszyscy zdają sobie sprawę z faktu, że jedną z teorii tłumaczących proces starzenia jest teoria wolnorodnikowa [50]. Paradoksalnie zatem tlen, który w przypadku organizmów aerobowych jest niezbędnym warunkiem ich życia, byłby również czynnikiem limitującym długość życia organizmu.

Praca częściowo finansowana z grantu A.M. Bydgoszcz B.W. 27/98.

Artykuł otrzymano 29 czerwca 1998 r.

Zaakceptowano do druku 18 listopada 1998 r.

Piśmiennictwo

1. Rożyńska D (1994) *Kosmos* **43** (3-4): 507-521
2. Horst A (1994) *Kosmos* **43** (3-4): 523-536
3. Bartosz G (1995) *Druga twarz tlenu*. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa
4. Oliński R, Jurgowiak M (1996) W: Barciszewski J, Eastowski K, Twardowski T (red) *Nowe tendencje w biologii molekularnej i inżynierii genetycznej oraz medycynie*. Wydawnictwo Sorus, Poznań, 373-400
5. Gordon L I, Weitzman SA (1993) *Cancer Journal* **6**: 257-261
6. Cerutti P (1985) *Science* **227**: 375
7. Pitot HC, Goldsworthy T, Moran SJ (1981) *Supramol Struct Cell Biochem* **17**: 133-152
8. Dowjat K (1992) *Post Biol Kom* **19**: 255-262
9. Jaruga P, Oliński R (1994) *Post Hig Med Dośw* **48**: 443-456
10. Zastawny TH (1996) *Post Biochem* **42**: 31-41
11. Bessho T, Tano K, Kasai H, Ohtsuka E, Nishimura S (1993) *J Biol Chem* **268**: 19416-19421
12. Laval J, O'Connor TRO, D'Herin-Lagravera C, van der Kamp AP, Boiteux S (1990) W: Lambert MW, Laval J (red) *DNA repair mechanisms and their biological implication in mammalian cells*. New York, str 25-36
13. Chung MH, Kim HS, Ohtshuka E, Kasai H, Yamamoto F, Nishimura S (1991) *Biochem Biophys Res Commun* **178**: 1472-1478
14. Loft S, Fisher-Nielsen A, Jeding IB, Vistisen K, Poulsen H (1993) *J Toxicol Environ Health* **40**: 391-404
15. Shigenaga MK, Gimeno CJ, Ames BN (1989) *Proc Natl Acad Sci USA* **85**: 6465-6467
16. Culp SJ, Cho GP, Kadlubar FF, Evans FE (1989) *Chem Res Toxicol* **2**: 416-422
17. Cheng KC, Cahill DS, Kasai H, Nishimura S, Loeb LA (1992) *J Biol Chem* **267** (1): 166-172
18. Klein JC, Blecker MJ, Saris CP, Roelen HCPF, Brugghe HF, van den Elst H, van der Marel GA, van Boon JH, Westra JG, Kriek E, Berns AJM (1992) *Nucleic Acids Res* **20**: 4437-4443
19. Wood ML, Esteve A, Morningstar ML, Kuziemko GM, Essigmann JM (1992) *Nucleic Acids Res* **20**: 6023-6032
20. Białkowski K, Oliński R (1997) *Post Biochem* **43**: 199-208
21. Mamiya H, Miura H, Murata-Kamiya N, Ishikawa H, Sakaguchi T, Inoue H, Sasaki T, Masutani Ch, Hanaoka F, Nishimura S, Ohtsuka E (1995) *Nucleic Acids Res* **23**: 2893-2899
22. Kamiya H, Ueda T, Oghi T, Matsukage A, Kasai H (1995) *Nucleic Acids Res* **23** (5): 761-766
23. Kamiya H, Kasai H (1996) *FEBS Letters* **391**: 113-116
24. Kamiya H, Kasai H (1997) *Nucleic Acids Res* **25** (2): 304-310
25. Pural AA, Wah Kow Y, Wallace SS (1994) *Nucleic Acids Res* **22**: 72-78
26. Feig DI, Sowers LC, Loeb LA (1994) *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 6609-6613
27. Ono T, Negishi K, Hayatsu H (1995) *Mut Res* **326**: 175-183
28. Demple B, Harrison L (1994) *Annu Rev Biochem* **63**: 915-948
29. Feig DI, Reid TM, Loeb LA (1994a) *Cancer Res (Suppl)* **54**: 1890-1894
30. Hussain SP, Aguilar F, Amstad P, Cerutti P (1994) *Oncogene* **9**: 2277-2281
31. Le Page F, Margot A, Grollman AP, Sarasin A, Gentil A (1995) *Carcinogenesis* **16** (11): 2779-2784
32. Dole R (1978) *Cancer Res* **38**: 3573-3583
33. US Department of Health Education and Welfare, Smoking and Health. A Report of the Surgeon General (1988) DHEW Publication, No. (PHS) 79-50066, str 5
34. Jaruga P, Zastawny T, Skokowski J, Dizdaroglu M, Oliński R (1994) *FEBS Lett* **341**: 59-64
35. Carter HB, Coffey DS (1988) W: Coffey DS, Resnick MI, Dorr FA, Karr JP (red) *A multidisciplinary analysis of controversies in the management of prostate cancer*. New York, Plenum Press, str 1-7
36. Oliński R, Zastawny TH, Budzbon J, Skokowski J, Zegarski W, Dizdaroglu M (1992) *FEBS Lett* **309** (2): 193-198
37. Dizdaroglu M, Oliński R, Doroshov JH, Akman SA (1993) *Cancer Res* **53**: 1269-1272
38. Szatrowski TP, Nathan CF (1991) *Cancer Res* **51**: 794-798
39. Oliński R, Zastawny TH, Foksiński M, Barecki A, Dizdaroglu M (1995) *Free Radic Biol Med* **18**: 807-813
40. Oberley TD, Oberley LW (1997) *Histol Histopathol* **12**: 525-535
41. Sun Y (1990) *Free Radic Biol Med* **8**: 583-599
42. Kasprzak KS, Jaruga P, Zastawny TH, North SL, Riggs ChW, Oliński R, Dizdaroglu M (1997) *Carcinogenesis* **18**: 271-277
43. Malins DC, Polisser NL, Gunselman SJ (1994) *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 2557-2563
44. Oliński R, Jaruga P, Foksiński M, Białkowski K, Tujakowski J (1997) *Molec Pharmacol* **52**: 882-885
45. Lajtha LG (1981) *Blood Cells* **7**: 45-62
46. Pennisi E (1997) *Science* **275**: 1576-1568

47. Jurgowiak M, Białkowski K, Oliński R (1996) *Post Biochem* 42: 6-13
48. Sundaresan M, Yu ZX, Ferrans VJ, Irani K, Finkel T (1995) *Science* 270: 296
49. Doll R, Peto R (1981) The causes of cancer: Quantitative

- estimates of avoidable risk of cancer in the United States Today, Oxford University Press, Oxford
50. Jurgowiak M, Oliński R (1998) *Kosmos* 47: 1-11
51. Yu B P (1994) *PSEBM* 205: 97-105

Adaptacja błon tylakoidowych do zmiennych warunków świetlnych środowiska

Adaptation of thylakoids membranes to environmental light conditions

ELŻBIETA ROMANOWSKA*

Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Kompleksy białkowe błon tylakoidowych
- III. Molekularna organizacja błon tylakoidowych w warunkach niskiego i wysokiego natężenia światła
- IV. Rozdział energii świetlnej pomiędzy PSI i PSII — przejście ze stanu 1 do stanu 2
- V. Fotoinhibicja
- VI. Regulacja organizacji i funkcji błon tylakoidowych
- VII. Podsumowanie

Wykaz stosowanych skrótów: Chl — chlorofil; CP25, CP27, CP29, LHCII — kompleksy chlorofil a/b-białko PSII; CP43 — kompleks chlorofil a z białkiem psbC PSII; CP47 — kompleks chlorofil a z białkiem psbB PSII; PSI — fotoukład I; PSII — fotoukład II

I. Wstęp

Zmieniające się warunki świetlne podczas wzrostu roślin indukują procesy adaptacyjne zachodzące w obrębie błon tylakoidowych. Przystosowanie roślin do światła jako czynnika środowiskowego zachodzi zasadniczo w dwóch kierunkach: maksymalnego wykorzystania tego czynnika oraz ochrony przed jego nadmiernym działaniem. Duże natężenie światła wiąże się często ze wzrostem temperatury, zarówno rośliny jak i otoczenia, co z kolei ma wpływ na bilans wodny. Dlatego w wielu przypadkach trudno jest rozgraniczyć działanie poszczególnych czynników środowiskowych. Niekorzystne warunki świetlne środowiska mogą indukować długotrwałe zmiany ewolucyjne często sprzężone z odpowiedzią na inne czynniki stresowe np. suszę i doprowadzić do modyfikacji obejmujących

Contents:

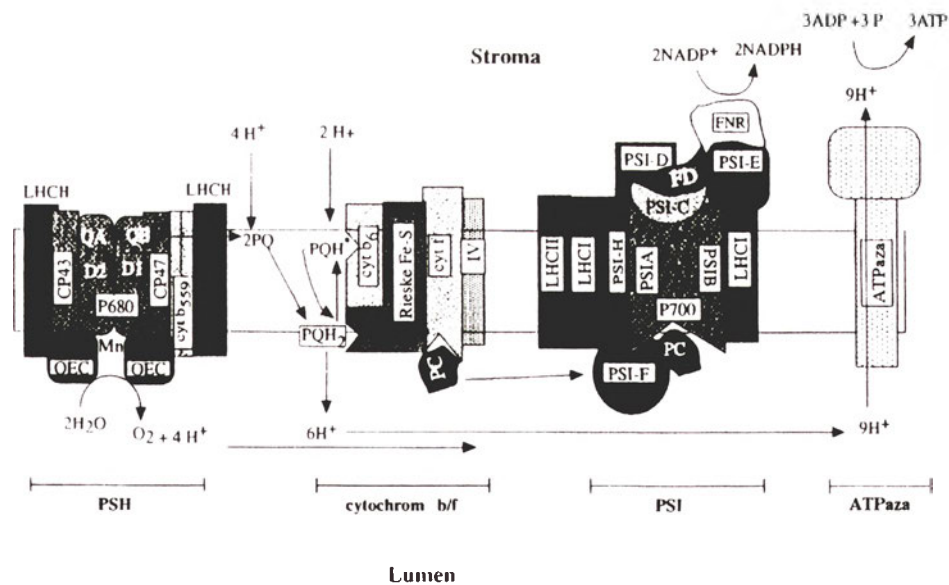
- I. Introduction
- II. Protein complexes of thylakoid membranes
- III. Molecular organization of thylakoid proteins in low and high light
- IV. The distribution of energy between PSI and PSII — state 1 — state 2
- V. Photoinhibition
- VI. Regulation of thylakoid membrane organization and function
- VII. Concluding remarks

zmiany w budowie anatomicznej liści oraz struktury chloroplastów. Krótkotrwałe wzrost natężenia światła powoduje przystosowania modulacyjne zmierzające do zmniejszenia oświetlenia powierzchni np. poprzez ruch chloroplastów w komórce czy ruchy liści. Długotrwałe zmiany warunków świetlnych wywołują u roślin procesy adaptacyjne polegające na zmianie składu, organizacji i struktury błon tylakoidowych. Zdolność aparatu fotosyntetycznego do adaptacji wywołowanych zmianami środowiskowymi sugeruje, że zarówno organizacja jak i funkcja membran tylakoidowych nie jest statyczna lecz dynamiczna. Zmiany w wielkości anten energetycznych fotosystemów, stechiometria głównych przenośników elektronów, optymalizują odpowiedź roślin na zmiany środowiskowe. Adaptacja błon tylakoidowych do nowych warunków wymaga zmian strukturalno-funkcjonalnych i biosyntezy nowych komponentów. Dochodzi więc do interakcji procesu transkrypcji, translacji, transportu białek i tworzenia nowych kompleksów błonowych w obrębie chloroplastu.

II. Kompleksy białkowe błon tylakoidowych

W chloroplastach roślin wyższych możemy wyróżnić dwa systemy błon tylakoidowych: tylakoidy gran

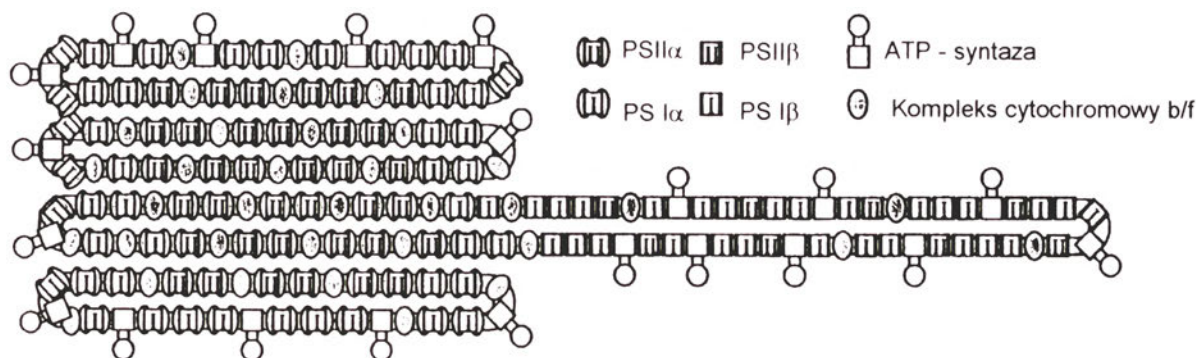
* Prof. dr hab., Zakład Fizjologii Roślin, Instytut Botaniki, Uniwersytet Warszawski, 00-927 Warszawa, Krakowskie Przedmieście 26/28



Ryc. 1. Fotosyntetyczny aparat transportu elektronów cyt_{b₆} — cytochrom b₆; cyt_{b₅₅₉} — cytochrom b₅₅₉; cyt_f — cytochrom f; CP43, CP47 — zbierające światło kompleksy chlorofil a — białko z kompleksu rdzeniowego PSII; D1 i D2 — białka stanowiące centra reakcji PSII; FD — ferredoksyna; FNR — oksydoreduktaza ferredoksyna:NADP⁺; LHCI(LHCII) — zbierający światło kompleks chlorofil a/b-białko związany z PSI(PSII); OEC — kompleks białkowy uczestniczący w wydzielaniu tlenu; PC — plastocjanina; PSI-A, PSI-B, PSI-C, PSI-D, PSI-E, PSI-F, PSI-H — podjednostki wchodzące w skład fotoukładu I; PQ — plastochinon; PQH* — semichinon; PQH₂ — plastochinol; P700 — centrum reakcji PSI; P680 — centrum reakcji PSII; PSI — fotoukład I; PSII — fotoukład II; QA — pierwszy chinonowy akceptor elektronów w PSII; QB — drugi chinonowy akceptor elektronów w PSII; Rieske Fe-S — białko Rieske; IV — podjednostka IV kompleksu cytochromowego b/f.

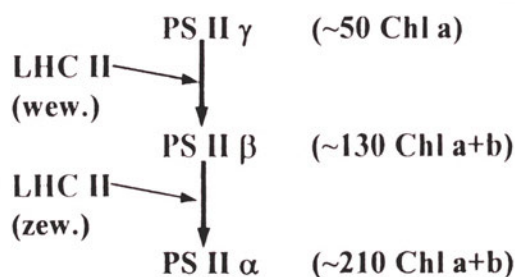
oraz tylakoidy stromy. Zachodzą w nich reakcje świetlne fotosyntezy związane z syntezą ATP oraz NADPH. Wnętrze chloroplastu wypełnia stroma, w której zachodzą reakcje ciemniowe fotosyntezy związane z asymilacją CO₂. W błonach tylakoidowych występują 4 główne kompleksy białkowe uczestniczące w reakcjach świetlnych fotosyntezy: PSI, PSII, kompleks cytochromowy b/f i syntaza ATP (Ryc. 1). Kompleksy te są heterogenne zarówno pod względem składu jak i funkcji. Rycina 2 przedstawia model organizacji błon tylakoidowych. W centrum gran występuje PSII α [1] charakteryzujący się dużym systemem antenowym. W PSII α stosunek chl a/b wynosi 1.8-2, a wielkość anteny to 250 cząsteczek chlorofilu i 0,5 cytochromu b/f/ na centrum reakcji [2]. Posiada on wewnętrzne anteny energetyczne (CP47 i CP43), silnie związane z białkami rdzeniowymi zawierające ok. 80 cząsteczek chlorofilu a [3, 4] oraz zewnętrzne anteny (CP25, CP27, CP29 i LHCII) różniące się składem biochemicznym, organizacją strukturalną,

zawierające zmienną ilość cząsteczek chlorofilu (a + b) oraz ksantofile, i w różny sposób zbierające energię [5-7]. Pierścień peryferyczny obejmujący obrzeża gran stanowi PSI α gdzie stosunek chl a/b wynosi 3.6, przy wielkości anteny 260-290 cząsteczek chlorofilu/P700 [8]. W lamellach stromy występuje głównie PSII β , który ma anteny mniejsze o 60-70% niż PSI α [8] oraz nieco PSII β o antenach około dwukrotnie mniejszych niż PSII α [9]. Prekursorem PSI α jest prawdopodobnie PSII β [4]. W czasie rozwoju plastydów PSII β jest formą dominującą. Mutanty chlorofilowe pozbawione PSII α nie posiadają anten pochłaniających światło. PSII λ obecny u mutantu jęczmienia chlorina f2, który zawiera tylko 50 cząsteczek chlorofilu a i jest całkowicie pozbawiony chlorofilu b oraz LHCII, może być wyjściową formą dla PSII α . Zapoczątkowane syntezę chlorofilu b inicjuje tworzenie anten wewnętrznych i powstawanie PSII β . Następnie zachodzi przyłączenie anten zewnętrznych i powstaje PSII α (Ryc. 3). Wielkość anten energetycznych PSII i PSI zależy od



Ryc. 2. Model organizacji tylakoidów ilustrujący lateralną heterogenność rozmieszczenia kompleksów białkowych w błonach. PSI α (PSII β) i PSII α (PSII β) — α centra (β centra) I i II układu fotosyntezy.

natężenia światła podczas wzrostu roślin [10]. Długotrwałe działanie niskich natężeń światła stymuluje powstawanie większych anten energetycznych zarówno w PSII jak i PSI, a wysokie natężenie światła powoduje zmniejszenie wielkości anten [11, 12]. Zmiany w wielkości anten wiążą się ze zmianami zewnętrznych anten PSII α zarówno pod względem składu peptydowego jak i zawartości chlorofilu [13]. Jak stwierdzono u *Chlorella vulgaris* anteny zewnętrzne mogą zawierać od 80 do 280 cząsteczek chlorofilu (a + b) na kompleks, najmniejsze anteny PSII α zawierają 210 cząsteczek Chl (a + b) [14] a największe ok. 400 cząsteczek Chl (a + b) [15]. Molekularny mechanizm regulacji wielkości anten jest nieznan. Oba fotoukłady stromowe mają mniejsze systemy antenowe niż granowe, ponieważ pozbawione są anten zewnętrznych [3, 16]. Ponad 85% PSII znajduje się w tylakoidach gran, a tylko 15% w tylakoidach stromy i na brzegach gran. Natomiast PSI zlokalizowany jest głównie w tylakoidach stromy (65%), a 35% tego fotoukładu znajduje się na brzegach gran [6]. Kompleks cytochromowy b/f jest rozmieszczony równomiernie pomiędzy oba typy błon, choć różni się zarówno składem jak i funkcją [17]. U organizmów eukariotycznych i sinic składa się on z 4 głównych polipeptydów: cytochromu f, cytochromu b, białka Riesego i podjednostki IV [18]. W kompleksie tym stwierdzono ponadto obecność białek niskocząsteczkowych (< 10 kDa) i plastocjaniny [19]. Cząstki kompleksu cytochromowego b/f pochodzące z błon granowych i stromowych wykazują pewien stopień heterogenności wyrażający się zmienną zawartością białka 4 kDa, plastocjaniny oraz bliżej nie poznanego białka 15 kDa [20, 21]. Ponieważ wyizolowany kompleks cytochromowy b/f jest mieszaniną monomeru i dimeru [22] to wg C r a m e r a i w s p. [23] przejście monomer-dimer może być mechanizmem regulującym cykliczny i niecykliczny transport elektronów w chloroplastach, forma dimeryczna byłaby odpowiedzialna za liniowy transport elektronów, a forma monomeryczna za nieliniowy. Wysoki stosunek NADPH/NADP⁺ preferuje cykliczny transport elektronów, kompleks cytochromowy b/f funkcjonuje wtedy w formie monomerycznej; stąd transport liniowy przebiegałby w obrębie gran, a cykliczny wyłącznie w obrębie tylakoidów stromy. Cykliczny transport elektronów może być mechanizmem, który w warunkach

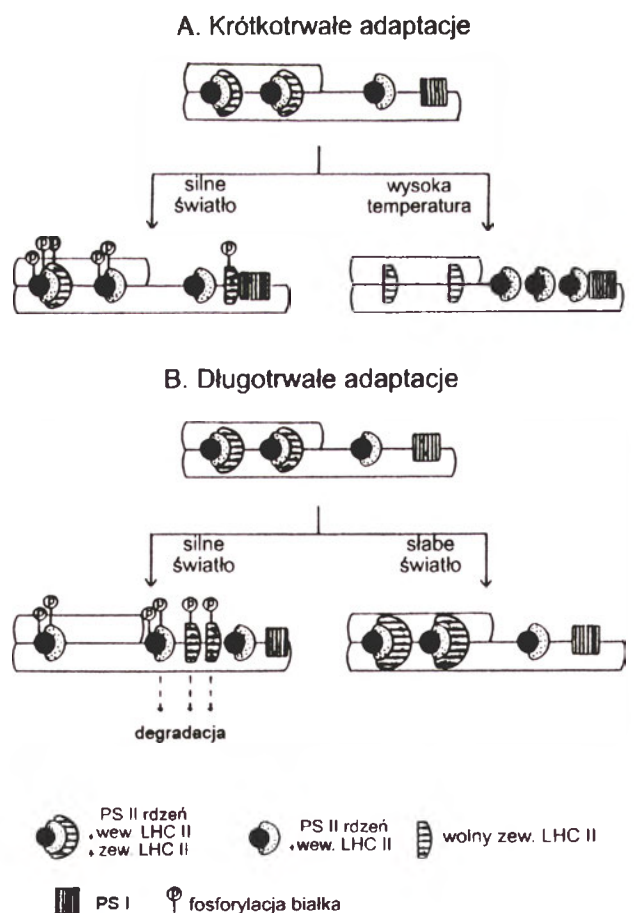


Ryc. 3. Schemat objaśniający etapy powstawania anten energetycznych w PSII. Objasnienia w tekście.

zagrożenia fotoinhibicją rozprasza energię wzbudzenia w obrębie PSII przez dezaktywację termiczną, co stwierdzono eksponując rośliny na światło o wysokim natężeniu [24, 25]. Syntaza ATP występuje na brzegach gran oraz w tylakoidach stromy [26]. Szczegółowo budowę molekularną błony tylakoidowej opisano w artykule przeglądowym [6].

III. Molekularna organizacja błon tylakoidowych w warunkach niskiego i wysokiego natężenia światła

Na schemacie (Ryc. 4B) przedstawiono zmiany adaptacyjne zachodzące w obrębie błon tylakoidowych spowodowane długotrwałym działaniem niskich i wysokich natężeń światła. Światło o niskim stężeniu stymuluje powstawanie dużych anten peryferycznych PSII α . Związane jest to ze zwiększoną syntezą chlorofilu b i ksantofili, głównie luteiny. Taki skład barwnikowy umożliwia lepsze wykorzystanie światła niebieskozielonego [27]. W warunkach niskiego natężenia światła, gdzie jest ono czynnikiem ograniczającym fotosyntezę stwierdzono 50-70% obniżenie ilości cytochromu b-559, cytochromu b-563, cytochromu f, plastochinonu (w przeliczeniu na zawartość chlorofilu) [28]. W silnym świetle, gdzie czynnikiem ograniczającym fotosyntezę jest szybkość transportu elektronów, notowano zwiększenie ilości cytochromu f [29]. Natę-



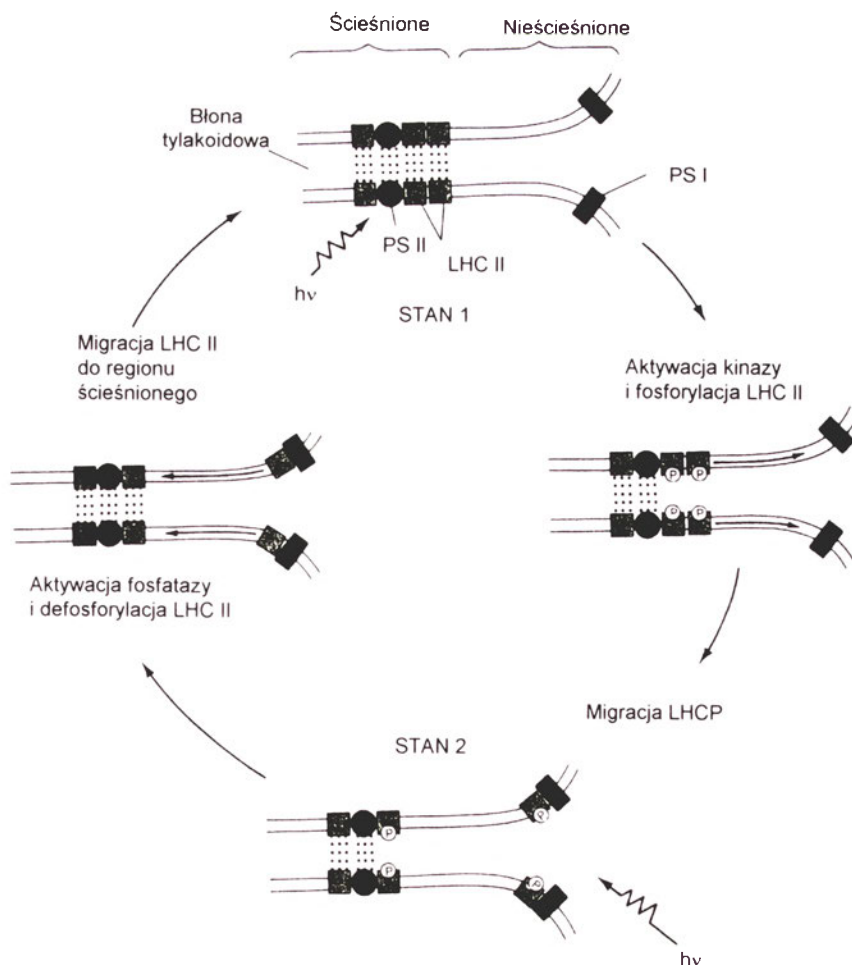
Ryc. 4. Schemat przedstawiający krótkoterminowe i długoterminowe zmiany adaptacyjne zachodzące w obrębie błon tylakoidowych na skutek działania światła lub temperatury.

zenie światła stanowi czynnik regulujący syntezę chlorofilu a i b, co przejawia się zwiększeniem stosunku Chl a/b w świetle o dużym natężeniu, ponieważ obniżona jest synteza Chl b. Ponadto w warunkach wysokiego natężenia światła obserwuje się zwiększenie zawartości β -karotenu i mniej ksantofili (głównie luteiny i neokszantyny) w porównaniu z roślinami rosnącymi w niskich natężeniach światła [30]. Liniowa zależność pomiędzy ilością plastochinonu, cytochromu f, podjednostkami CF1 syntazy ATP a natężeniem światła, sugeruje, że mechanizm regulujący biosyntezę tych związków jest podobny [31]. Struktura aparatu fotosyntetycznego roślin wyższych rosnących w niskich natężeniach światła, jest taka jak u roślin ceniolubnych lub rosnących w świetle wzbogaconym w czerwień. Natomiast rośliny rosnące w wysokich natężeniach światła wytwarzają aparat fotosyntetyczny jak rośliny światłolubne lub rosnące w świetle wzbogaconym w światło niebieskie [32-34]. Badania Humbeka i wsp. [35] pokazały, że światło niebieskie stosowane podczas wzrostu glonów *Scenedesmus* prowadziło do takich samych zmian jak niskie natężenia światła białego; natomiast światło czerwone, powodowało takie zmiany jak wysokie natężenia światła białego. Głony rosnące w świetle niebieskim cechowała większa zawartość chlorofilu i LHCII w komórce, w porównaniu z rosnącymi w świetle czerwonym. Wyniki tych badań dowodzą, że różnice adaptacyjne do światła niebieskiego i czerwonego u glonów mogły

wynikać z przystosowania do środowiska, w którym żyją, ponieważ ze wzrostem głębokości zwiększa się pochłanianie światła czerwonego, a dociera głównie światło niebieskozielone [36]. Podsumowując, rośliny przystosowane do wysokich natężeń światła cechują następujące parametry: mniej tylakoidów przypadających na granum, mniej LHCII i chlorofilu b; wykazują natomiast wyższą wartość stosunku chlorofilu a/b, zwiększoną zawartość przenośników elektronów (np. cytochromu f, ferredoksyny), mają wyższe natężenie reakcji Hilla oraz wyższe natężenie wiązania CO₂ [30, 32, 37]. Zmiany warunków świetlnych, zarówno natężenia jak i jakości obejmują np. liść, koronę drzew, łan, piętra lasu i zbiorniki wodne.

IV. Rozdział energii świetlnej pomiędzy PSI i PSII — przejście ze stanu 1 do stanu 2

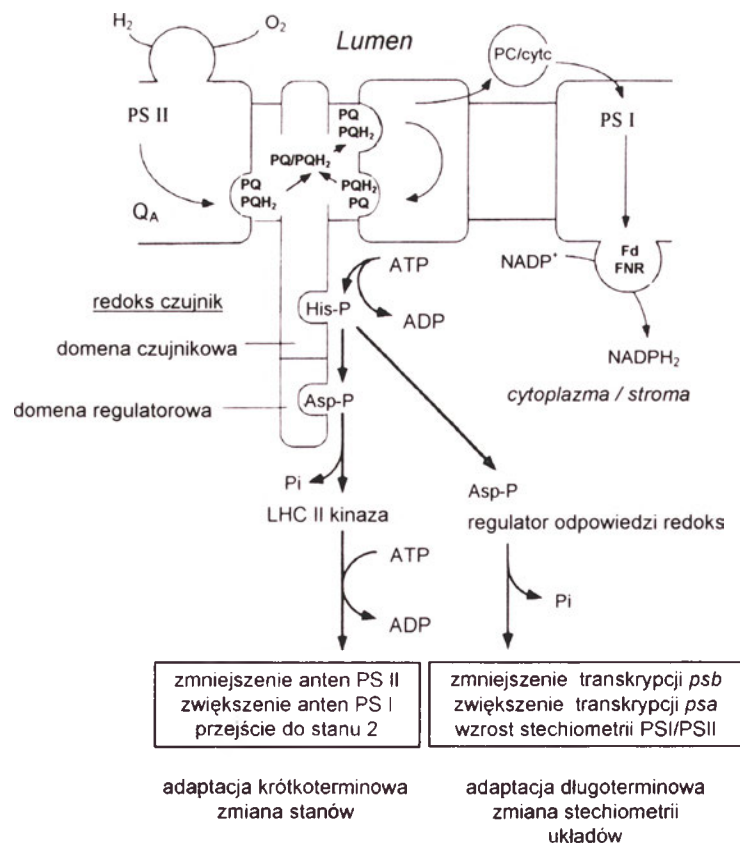
Mechanizm molekularny wyjaśniający w jaki sposób warunki świetlne wpływają na rozdział energii pomiędzy PSI i PSII nazywamy przejściem od stanu 1 do stanu 2 (Ryc. 5). W warunkach krótkotrwałego działania silnego światła, pula plastochinonu ulega redukcji (stan 2), a kinaza związana z cytochromem b/f aktywacji, i fosforyluje głównie białko 25 kDa anten energetycznych zewnętrznych PSII β . Larsson i Andersson [38] wydzielili z liści szpinaku dwie klasy LHCII: 25 oraz 27 kDa i stwierdzili, że w skład mobilnej puli peryferycznej, wchodzi głównie białko 25



Ryc. 5. Schemat obrazujący przejście ze stanu 1 do stanu 2 pod wpływem światła. Opis w tekście.

kDa. Fosforylacja białek tylakoidowych PSII przez aktywowaną światłem kinazę powoduje obniżenie transportu elektronów w obrębie PSII [39]. Aktywność kinazy jest regulowana zarówno przez stan redoks puli plastochinonowej [40, 41] jak i stosunek ATP/ADP; ADP jest inhibitorem kinazy, nawet w obecności zredukowanego plastochinonu [42, 43]. Stwierdzono, że aktywność kinazy LHCII wymaga obecności kompleksu cytochromowego b/f [44]. U mutantów *Lemma* pozbawionych kompleksu cytochromowego b/f stwierdzono brak fosforylacji LHCII, podczas gdy fosforylacja innych białek PSII była niezmienną [45]. Autorzy uważają, że kontrola aktywności kinazy LHCII znajduje się w miejscu Q_o (utleniającym plastochinol) kompleksu cytochromowego b/f, a za fosforylują białek PSII odpowiedzialne są różne kinazy. Gal i w s p. [46] wykazali, metodą immunologiczną, że kinaza LHCII zlokalizowana jest na brzegach gran, co jest spójne z koncepcją, że LHCII tylko z tej części gran ulega przemieszczaniu do lamelli stromy. Fosforylacja białek LHCII powoduje zmianę ich struktury trzeciorzędowej, rozpad form trimerycznych na monomery, które następnie oddysocjują z PSII α i przemieszczają się latealnie do membran stromowych gdzie ulegają asocjacji z PSII β [47-49]. Przemieszczanie się anten LHCII z lamelli granowych do stromowych potwierdziły badania z zastosowaniem mikroskopu elektronowego i techniki „freeze-fracture” [49]. Asocjacje LHCII z PSII β udowodniono przy pomocy spektroskopii fluorescencyjnej [50]. Gdy pula PQH₂ ulega utlenieniu (stan 1), obniża się aktywność kinazy i zachodzi defosforylacja LHCII przy udziale fosfatazy,

a utrata ładunku ujemnego powoduje jego powrót do gran i połączenie z PSII α . Powstaje trimer LHCII będący anteną peryferyczną PSII. Strategia ta zmniejsza wielkość anten PSII α a zwiększa PSII β . Jest to krótkotrwały regulatorowy mechanizm chroniący PSII przed fotoinhibicją i pozwalający na równomierny rozdział energii wzbudzenia pomiędzy oba fotosystemy. Adaptacja ta funkcjonuje na etapie posttranslacyjnej modyfikacji istniejących białek. Brak jest jednak bezpośrednich danych doświadczalnych, że ufosforylowany LHCII może przekazywać energię do PSII β . Horton i Black [39] uważają, że fosforylacja LHCII i dysocjacja z PSII pozwala jedynie na zmniejszenie przekazu energii wzbudzenia do centrów PSII. Jansson i w s p. [51] wykazali, że białka LHCII: 25 i 27 kDa są produktami różnych *cap* genów. Adaptacja długoterminowa do wysokich natężeń światła może więc być realizowana na etapie transkrypcji i prowadzić do zmian stechiometrii PSI i PSII. Obecnie uważa się, że ten sam „czujnik redoksowy” odpowiedzialny jest zarówno za zmianę stanów (adaptacja krótkoterminowa) jak i stechiometrię układów (adaptacja długoterminowa) [48, 52]. Proponowany przez Allena i Nilssona (1997) mechanizm adaptacji przedstawiono na rycinie 6. Termin „czujnik redoksowy” jest proponowany dla przenośnika elektronów zlokalizowanego w błonach tylakoidowych chloroplastów lub w wewnętrznej błonie mitochondrialnej. Czujnik ten kontroluje ekspresję genów poprzez zmiany potencjału oksydoredukcyjnego powstające przy jego autofosforylacji, prowadząc w końcowym efekcie do fosforylacji regulatora odpowiedzi redoks. Regula-



Ryc. 6. Mechanizm krótkoterminowej i długoterminowej adaptacji aparatu fotosyntetycznego poprzez kontrolę stanu redoksowego fotoukładów (wg [48], zmodyfikowane). Objasnienia w tekście.

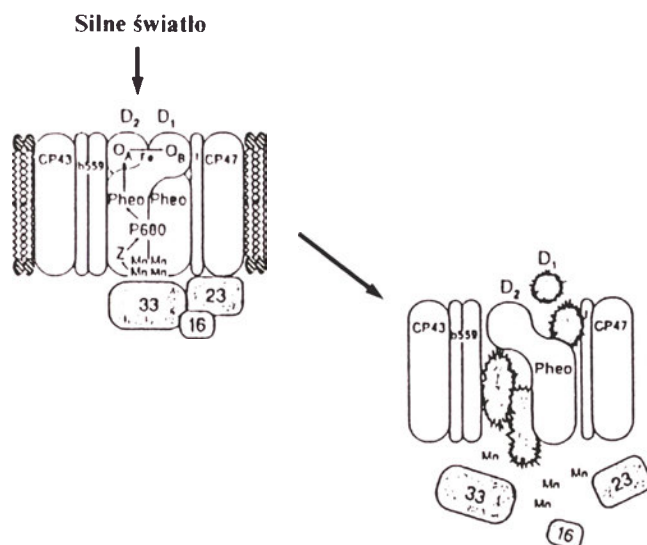
tor odpowiedzi redoks natomiast, jest białkiem wiążącym się z DNA, którego fosforylacja jest niezbędna do przyłączenia polimerazy RNA i inicjacji transkrypcji genu. Według Allen a „czujnik redoksowy” (ang. *redox sensor*) zawiera domenę czujnikową oraz regulatorową, i jeśli kinetycznie faworyzowana jest droga wewnątrzcząsteczkowego przeniesienia fosforanu to fosforylacja asparagianu (Asp) domeny regulatorowej czujnika inicjuje aktywację kinazy LHCI (stan 2) i mamy do czynienia z adaptacją krótkoterminową. Jeśli natomiast kinaza jest w pełni zaktywowana, zachodzi fosforylacja asparagianu „regulatora odpowiedzi redoksowej”, (ang. *redox response regulator*) odpowiedzialnego za regulację stechiometrii fotosystemów (adaptacja długoterminowa). Odbyna się to poprzez kontrolę ekspresji genów a „czujnikiem” jest stopień redukcji puli plastochinonowej [53]. Stwierdzono [54], że 10-krotne obniżenie natężenia światła powodowało u glonu *Dunaliella tertiolecta* już w ciągu 9 h czterokrotny wzrost *lhcb* mRNA i trzykrotne zwiększenie zawartości LHCI. Escoubasi w sp. [55] wykazali, że ekspresja genu *Lhcb* jest regulowana na poziomie transkrypcji.

W niskiej temperaturze brak jest migracji LHCI choć kinaza jest aktywowana [56]. Brak przemieszczania LHCI w tych warunkach związany jest z mniejszą płynnością dwuwarstwy lipidowej. Krytyczną temperaturą jest 10°C. Dynamiczne i odwracalne zmiany w organizacji błon tylakoidowych obserwowano również po krótkotrwałym działaniu wysokich temperatur. Powyżej 30°C obserwuje się, że zewnętrzne anteny energetyczne PSII α oddysocjują od fotoukładu (Ryc. 4A), ale nie migrują do membran stromowych. Anteny zewnętrzne pozostają w granach, a do błon stromowych migruje reszta kompleksu PSII α i łączy się z PSII β . W tym przypadku ciepło indukuje obniżenie energii wzbudzenia PSII α i chroni przed fotodestrukcją.

V. Fotoinhibicja

Wysokie natężenia światła działa destrukcyjnie głównie na PSII [57-59]. Czulym wskaźnikiem zaburzeń w błonach chloroplastowych są pomiary indukowanej fluorescencji chlorofilu a [60]. Fluorescencja rejestrowana w temperaturze pokojowej pochodzi głównie z PSII, natomiast schłodzenie liści do 77 K pozwala uzyskać widmo emisji fluorescencji obu fotoukładów. Pomiary sygnału indukowanej fluorescencji ujawniły, że nadmierne oświetlenie liścia powodowało obniżenie fluorescencji. Dotyczyło to fluorescencji maksymalnej (Fm), zmiennej (Fv), fluorescencji pików (Fp) i stanu stacjonarnego (Ft). Natomiast fluorescencja podstawowa (Fo) zależała od gatunku i warunków wzrostu roślin [61]. Rozmiary fotoinhibicji najlepiej odzwierciedla stosunek fluorescencji zmiennej do maksymalnej (Fv/Fm), który jest miarą potencjalnej wydajności pierwotnych reakcji fotochemicznych PSII. Fotoin-

hibicji towarzyszy obniżenie wartości Fv/Fm [62, 63]. Przyczyną obniżenia intensywności fluorescencji może być zwiększenie termicznego rozpraszania energii wzbudzenia w kompleksach antenowych PSII spowodowane tworzeniem zeaksantyny z wiołaksantyny w cyklu ksantofilowym [64]. Długotrwałe działanie wysokich natężeń światła na rośliny prowadzi do utraty aktywności fotochemicznej PSII oraz degradacji białka D1. (Ryc. 7). Przypuszcza się, że nadmierne natężenie światła powoduje znaczną redukcję puli PQ [65], a przez to akumulację rodników chinonowych w miejscu Q_B białka D1. Aniony te mogą ulegać autooksydacji pod wpływem tlenu cząsteczkowego z wytworzeniem anionu ponadtlenkowego, który indukuje reakcje prowadzące do powstania rodników hydroksylowych. Rodniki hydroksylowe i tlenowe odpowiedzialne są za uszkodzenie białka D1, a w konsekwencji za jego degradację [60, 65, 66]. Degradacja białka D1 w centrach PSII α powoduje częściowy rozpad rdzeniowego kompleksu PSII, a następnie indywidualną migrację niektórych podjednostek kompleksu do tylakoidów stromowych [67]. Przypuszcza się, że ruch podjednostek PSII ze ściśniętych regionów chloroplastów do nieściśniętych jest elementem cyklu naprawczego PSII [67, 68]. Wiadomo, że prekursor białka D1 jest wbudowywany do błony lamelli stromowych, gdzie łączy się z pozostałymi komponentami kompleksu tworząc PSII α ; PSII β jest odporny na fotoinhibicję [9]. Procesy odpowiedzialne za rozpraszanie energii wzbudzenia i adaptację aparatu fotosyntetycznego do światła o zwiększonej intensywności, a także reaktywacja PSII spełniają ważną rolę w utrzymaniu aktywności fotosyntetycznej roślin w warunkach nadmiernego oświetlenia. Podatność roślin na fotoinhibicję jest zdeterminowana genetycznie, a ponadto zależy od przystosowania roślin do wzrostu w określonych warunkach świetlnych [69, 70]. Rośliny rosnące w warunkach słabego oświetlenia ulegają silniejszej fotoinhibicji pod wpływem nagłego wzrostu



Ryc. 7. Rozpad PSII po degradacji białka D1 na skutek działania silnego światła.

natężenia światła niż rośliny rosnące w wysokich natężeniach światła, gdyż posiadają one bardziej rozbudowane układy zbierające światło [57, 69, 70]. Światło i stresy środowiskowe wywierają synergistyczny wpływ na proces fotoinhibicji [71-73]. Synergizm przejawia się w większym stopniu na poziomie ochrony i naprawy niż w procesie fotoinaktywacji. Stwierdzono różną wrażliwość na fotoinhibicję u różnych gatunków roślin. Molekularny mechanizm fotoinhibicji opisano w pracy [74].

VI. Regulacja organizacji i funkcji błon tylakoidowych

Mechanizm optymalizujący wielkość kompleksów w błonach fotosyntetycznych poprzez zmiany pól metabolitów komórkowych regulowany jest warunkami środowiskowymi. Główną rolę w transmisji sygnałów środowiskowych odgrywają tu ATP i NADPH, którym przypisuje się istotną rolę w regulacji ekspresji genów [21]. Niektóre czynniki środowiskowe powodują hamowanie transportu elektronów w obrębie PSII. W takich warunkach przenośniki elektronów pomiędzy dwoma fotosystemami są utlenione (identyfikacja sygnału). Hamowaniu niecyklicznego transportu elektronów towarzyszy wzmocnienie transportu cyklicznego i zwiększenie syntezy ATP co powoduje wzrost stosunku ATP/NADPH w stromie [75]. Modulacja puli ATP/NADPH odgrywa ważną rolę w transmisji sygnału środowiskowego. (Ryc. 8). Może ona przejawiać się w dwóch kierunkach: a. poprzez regulację ekspresji genów dla wzmocnienia syntezy kompleksu PSII, b. poprzez wzrost aktywności proteaz degradujących inne komponenty błon tylakoidów. Odpowiedź błon fotosyntetycznych (adaptacja) jest koordynowana poprzez biosyntezę i degradację kompleksów w chloroplastach. Ponieważ część białek kompleksów chloroplastowych kodowana jest zarówno

przez genom własny jak i jądrowy, transmisja sygnału wymaga współdziałania obu genomów. Regulacja i koordynacja genomów w procesie transkrypcji/translacji oraz biosyntezy/organizacji kompleksów błon tylakoidowych nie jest w pełni wyjaśniona.

VII. Podsumowanie

Zmiana warunków świetlnych podczas wzrostu roślin prowadzi do powstania w obrębie błon chloroplastowych przystosowań warunkujących utrzymanie aktywności fotosyntetycznej roślin w wyniku:

- 1) syntezy nowych komponentów fotoukładów lub/ oraz przenośników elektronów
- 2) zmiany rozdziału energii pomiędzy PII i PSI wskutek przemieszczania się kompleksów białkowych
- 3) chwilowej degradacji oraz odbudowywaniu uszkodzonych struktur.

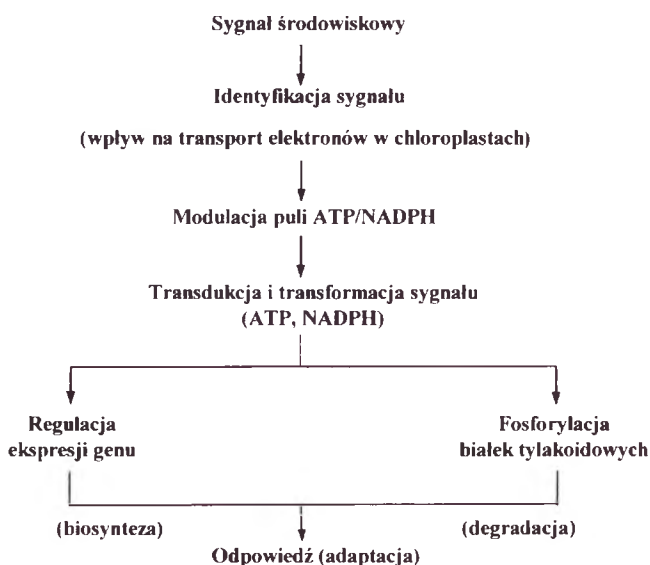
Napisanie tego artykułu było możliwe dzięki sfinansowaniu przez Grant KBN 6 PO4C 001 14 uczestnictwa autorki w XI Międzynarodowym Kongresie Fotosyntetycznym.

Artykuł otrzymano 24 września 1998 r.

Zaakceptowano do druku 23 listopada 1998 r.

Piśmiennictwo

1. Melis A, Homann P M (1978) *Arch Biochem Biophys* **190**: 523-530
2. Svensson P, Yu S G, Larsson V K, Andreasson E, Albertsson P-A (1990) W: Baltscheffsky M (red) *Current Research in Photosynthesis* t 2, Kluwer, Academic Publishers, Dordrecht str 839-842
3. Albertsson P-A (1995) *Photosynth Res* **46**: 141-149
4. Melis (1991) *Biochim Biophys Acta* **1058**: 87-106
5. Jackowski G, Kluck E (1994) *Z Naturforsch* **49c**: 337-342
6. Jackowski G (1997) *Post Biol Kom* **24**: 469-490
7. Jackowski G (1993) *Post Biol Kom* **20**: 59-68
8. Svenson P, Andreasson E, Albertsson P-A (1991) *Biochim Biophys Acta* **1060**: 45-50
9. Mäanpää P, Andersson B, Sundby C (1987) *FEBS Lett* **215**: 31-36
10. Melis A, Aanodori A, Glick R E, Ghirardi M L, McCauley S W, Neale P J (1985) *Physio Veg* **23**: 757-765
11. Smith B M, Melis A (1987) *Plant Physiol* **84**: 1325-1330
12. Smith B M, Melis A (1988) *Plant Cell Physiol* **29**: 761-769
13. Maenpää P, Andersson B (1989) *Z Naturforsch* **44**: 403-406
14. Morrissey P J, Glick R E, Melis A (1989) *Plant Cell Physiol* **30**: 335-344
15. Ley A C, Mauzerall D C (1982) *Biochim Biophys Acta* **680**: 95-106
16. Andreasson E, Albertsson P-A (1993) *Biochim Biophys Acta* **1141**: 175-182
17. Romanowska E (1994) *Post Biochem* **40**: 59-63
18. Hauska G, Hurt E, Gabellini N, Lockau W (1983) *Biochim Biophys Acta* **726**: 97-133
19. Romanowska E, Albertsson P-A (1994) *Plant Cell Physiol* **35**: 557-568
20. Romanowska E, Albertsson P-A (1992) W: Murata N (red) *Research in Photosynthesis*, t. 2 Kluwer Academic Publishers, str 507-510
21. Romanowska E, Albertsson P-A (1995) W: Mathis P (red) *Photosynthesis: From Light to Biosphere*, t 2, Kluwer Academic Publishers, str 607-610
22. Chain R K, Malkin R (1991) *Photosynth Res* **28**: 59-68
23. Cramer W A, Black M T, Widger W R, Girvin M E



Ryc. 8. Schemat regulacji struktury, organizacji i funkcji błon fotosyntetycznych poprzez modulację pól metabolitów. Opis w tekście.

- (1987) W: Barber J (red) The light reactions, Elsevier Sci Pub Inc New York, str 447-493
24. Havaux M (1992) *Plant Cell Physiol* **33**: 799-803
 25. Topf J, Gong H, Timberg R, Mets L, Ohad I (1992) *Photosynth Res* **32**: 59-69
 26. Miller K R, Stachelin L A (1976) *J Cell Biol* **68**: 30-47
 27. Andersson B, Andersson J M (1980) *Biochim Biophys Acta* **593**: 427-440
 28. Rühle W, Wild A (1979) *Planta* **146**: 377-385
 29. Andersson J M (1986) *Ann Rev Plant Physiol* **37**: 93-136
 30. Lichtenthaler H K, Buschmann C, Doll M, Fietz H J, Bach T et al (1981) *Photosynth Res* **2**: 115-141
 31. Leong T M, Anderson J M (1984) *Photosynth Res* **5**: 117-128
 32. Lichtenthaler H K (1981) W: Akoyunoglou G (red) Photosynthesis, t 6 Balaban Inter Sci Series, Philadelphia str 278-288
 33. Buschmann C, Meier D, Kleudgen H K, Lichtenthaler H K (1978) *Photochem Photobiol* **27**: 195-198
 34. Lichtenthaler H K, Buschmann C (1978) W: Akoyunoglou G, Argyroudi — Akoyunoglou J H (red) Chloroplast Development: Elsevier Amsterdam str 801-816
 35. Humbeck K, Schumann R, Senger H (1984) *Blue Light Effect in Biological Systems*. Berlin, Springer-Verlag str 359-365
 36. Larkum A W D, Barrett J (1983) *Adv Bot Rev* **10**: 1-29
 37. Boardman N K (1977) *Ann Rev Plant Physiol* **28**: 355-377
 38. Larsson U K, Andersson B (1985) *Biochim Biophys Acta* **809**: 396-402
 39. Horton P, Black M T (1981) *FEBS Lett* **132**: 75-77
 40. Allen J F (1983) *CRC Crit Rev Plant Sci* **1**: 1-22
 41. Bennett J (1981) *Eur J Biochem* **118**: 61-70
 42. Baker N R, Markwell J P, Thornberg J P (1982) *Photochem Photobiophys* **4**: 211-217
 43. Horton P, Foyer C (1983) *Biochem J* **210**: 517-521
 44. Gal A, Shahak Y, Schuster G, Ohad I (1987) *FEBS Lett* **221**: 205-210
 45. Gal A, Schuster G, Frid D, Cawaani O, Schwienger H G, Ohad I (1988) *J Biol Chem* **263**: 7785-7791
 46. Gal A, Hauska G, Herrmann K, Ohad I (1990) *J Biol Chem* **265**: 19742-19749
 47. Kühlbrandt W, Wahg D N, Fujiyoshi Y (1994) *Nature (Lond)* **367**: 614-621
 48. Allen J F, Nilsson A (1997) *Physiol Plantarum* **100**: 863-868
 49. Simpson D J (1983) *Biochim Biophys Acta* **725**: 113-120
 50. Bassi R, Giacometti G M, Simpson D J (1988) *Biochim Biophys Acta* **935**: 152-165
 51. Jansson S, Sestam E, Gustafsson P (1990) *Biochim Biophys Acta* **1019**: 110-114
 52. Allen J F (1995) *Physiol Plant* **93**: 196-205
 53. Durnford D G, Falkowski P G (1997) *Photosynth Res* **53**: 229-241
 54. LaRoche J, Mortain-Bertrand A, Falkowski P G (1991) *Plant Physiol* **97**: 147-153
 55. Escoubas J M, Lomas M, LaRoche J, Falkowski P G (1995) *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 10237-10241
 56. Val J, Baker N R (1989) *Physiol Plant* **77**: 420-426
 57. Powles S B (1984) *Ann Rev Physiol* **35**: 15-44
 58. Cleland R E, Critchley C (1985) *Photobiochem Photobiophys* **10**: 83-92
 59. Havaux M, Elyletters M (1991) *Z Naturforsch* **46c**: 1038-1044
 60. Kyle D J (1987) W: Barber J (red.) Topics in Photosynthesis t 9, Amsterdam, New York, Oxford, Elsevier, str 197-226
 61. Schreiber V, Bilger W (1985) prezentowane na: *Nato Advanced Research Workshop, Sesimbra, Portugal, October 1985*
 62. Krause G H, Semersalo S (1989) *Phil Trans R Soc Lond B* **323**: 281-293
 63. Krause G H, Semersalo S, Zumbush E, Weyers B, Laasch H (1990) *J Plant Physiol* **136**: 472-479
 64. Krause G H (1991) *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **42**: 313-349
 65. Kyle D J, Ohad I, Arntzen C J (1984) *Proc Natl Acad Sci USA* **81**: 4070-4074
 66. Kuhn M, Böger P (1990) *Photosynth Res* **23**: 291-296
 67. Hundal T, Virgin I, Styring S, Andersson B (1990) *Biochim Biophys Acta* **1017**: 235-241
 68. Andersson B, Styring S (1991) W: Lee C P (red) Current Topics in Bioenergetics t 16, New York, Academic Press, str 2-81
 69. Andersson J M, Osmond C B (1987) W: Barber J (red) Topics in Photosynthesis, t 9, Amsterdam, New York, Oxford, Elsevier, str 1-38
 70. Osmond C B (1981) *Biochim Biophys Acta* **639**: 77-98
 71. Boyer J S, Armond P A, Sharp R E (1987) W: Barber J (red.) Topics in Photosynthesis t 9, Amsterdam, New York, Oxford, Elsevier, str 111-112
 72. Sharma P K, Hall D O (1989) W: Barber J, Malkin R (red) Technics Plenum Press, str 571-577
 73. Critchley C (1980) *Aust J Plant Physiol* **5**: 27-41
 74. Sączynska V (1993) *Post Biol Kom* **20**: 45-65
 75. Arnon D I, Chain R K (1975) *Proc Natl Acad Sci USA* **72**: 4961-4965

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

Nadanie bibliotece Instytutu Biochemii i Biofizyki Polskiej Akademii Nauk imienia Józefa Hellera

W dniu 24 listopada 1998 roku w Instytucie Biochemii i Biofizyki Polskiej Akademii Nauk na posiedzeniu Rady Naukowej odbyła się uroczystość nadania instytutowej bibliotece imienia Prof. Józefa Hellera, założyciela i pierwszego dyrektora Instytutu. Na posiedzenie przybyła Rodzina Profesora: Jego córki, p. Maria Heller z mężem i p. Zofia Wojnowska, oraz wnuczka i trzech wnukowie, jeden z nich z żoną, a także prawnuk i prawnuczka. Obecny był także prof. Tadeusz Korzybski, dziś emerytowany kierownik Zakładu Biochemii Porównawczej PAN — zaczątku Instytutu tworzonego przez Prof. Hellera. W audytorium Instytutu uroczystość zagaił witając Gości dyrektor IBB, prof. Włodzimierz Zagórski-Ostoja. Następnie jeden z pierwszych uczniów prof. Hellera, prof. Przemysław Szafrąński, nakreślił Jego sylwetkę i przypomniał historię organizowania przez Profesora Zakładu Biochemii Polskiej Akademii Nauk obejmującego początkowo kilka pracowni, a przekształconego w Instytut Biochemii i Biofizyki PAN w 1957 roku. W swoim przemówieniu prof. Szafrąński podkreślił jak dalekowzroczną wizję kierunków badań w Instytucie miał Prof. Heller, a także Jego zasługi w promowaniu wyników już prowadzonych badań na międzynarodowym forum naukowym. Gość Instytutu, prof. Wacław Szybalski, który mówił o przedwojennych czasach lwowskich swojej znajomości z Profesorem, wspominał też o swojej wizycie w Instytucie w latach 60-tych i zaskoczeniu bardzo trudnymi warunkami pracy w laboratoriach w zestawieniu z publikowanymi znaczącymi osiągnięciami naukowymi. Odślonięcia tablicy z napisem „Biblioteka im. Józefa Hellera” umieszczonej w holu wejściowym Instytutu dokonała prof. Maria M. Jeżewska, ostatnia doktorantka Profesora. Po zwiedzeniu biblioteki Goście wraz z prof. prof. Jeżewską, Korzybskim, Szafrąnskimi, Zagórskimi i doc. Wielgatem w gabinecie Dyrektora przy kawie wspominali różne zdarzenia z życia z prof. Hellera. Przywołano czas Jego medycznych studiów, rozpoczętych w 1916 r. na Uniwersytecie Jana Kazimierza we Lwowie i przeplatanych kilkuletnią służbą w Legionach Piłsudskiego. Wspomnienia o wykładach chemii fizjologicznej i fizjologii na Tajnym Uniwersytecie Warszawskim w czasie okupacji niemieckiej, wywózcę w 1944 roku do obozu pracy w Hanowerze i o służbie wojskowej po wyzwoleniu przez aliantów w Polskich Siłach Zbrojnych na Zachodzie, uświadomiły nam niezłomny patriotyzm Profesora i Jego wewnętrzną potrzebę podejmowania rozmaitych społecznych działań nawet w bardzo trudnych warunkach. O tym głębokim poczuciu społecznych powinności świadczy powojenna, wszechstronna działalność Profesora na rzecz odbudowy i rozwoju polskiej biochemii — naukowa, dydaktyczna, organizacyjna i wydawnicza. Po powrocie do Polski w 1946 r. Profesor objął Katedrę Fizjologii Zwierząt na Wydziale Przyrodniczym Uniwersytetu we Wrocławiu jednocześnie organizując filię Państwowego Zakładu Higieny w Szczecinie. W 1951 r. przeniósł się do Warszawy na Katedrę Chemii Fizjologicznej Akademii Medycznej. Rok później powstał Komitet Naukowy Biochemii i Biofizyki Polskiej Akademii Nauk, któremu Profesor przewodniczył do 1969 r. realizując powierzone Mu zadanie stworzenia centralnej placówki biochemicznej — Instytutu Biochemii i Biofizyki. Wspomnieliśmy spokojny sposób bycia Profesora nie zdradzający Jego rozlicznych obowiązków jak udział w Radach Naukowych wielu placówek naukowych, praca organizacyjna i redaktorska na rzecz licznych czasopism naukowych, krajowych i zagranicznych, czy reprezentowanie Polski w Międzynarodowej Unii Biochemicznej, której był vice-prezydentem przez 6 lat. Jego umiłowaniem była jednak nauka i zawsze znajdował czas na pogawędki w laboratoriach o naszych badaniach. Córki Profesora wspominały Jego ulubiony obiekt doświadczalny — jedwabniki snujące kokony nawet w domu Profesora i kolorowe wilczomlecзки oraz Jego wspaniałą pamięć pełną nie tylko naukowych teorii i wiadomości z różnych dziedzin lecz także „Iliady” po grecku, ksiąg „Pana Tadeusza” i różnych piosenek wojskowych. Czas niestety szybko zbiegł i wiele zdarzeń i refleksji związanych z postacią prof. Hellera, tak zasłużonego dla życia naukowego biochemików w Polsce, pozostało niewypowiedzianych.

Maria M. Jeżewska

Sprawozdanie z II Konferencji poświęconej pamięci Prof. Jana Jakuba Parnasa

Myślą i wolą wszystkich tych, którzy poczuwają się do dziedzictwa naukowego Profesora Jana Jakuba Parnasa, w Gdańsku, w dniach 11—13 września 1998 roku odbyła się druga, polsko-ukraińska konferencja poświęcona pamięci tego wielkiego biochemika. Doszło do niej dzięki ogromnemu zaangażowaniu dwóch osób: prof. Rostislava Stoiki ze Lwowa i prof. Stefana Angielskiego z Gdańska. Konferencja znalazła też swoją unikalną oprawę w Starym Gdańsku, jako że została wkomponowana w III-cie Dni Ukrainy w Gdańsku a jej obrady odbywały się w przepięknej sali Dworu Artusa.

Do udziału w Konferencji zgłosiło się 112 osób, w tym ponad 40 z Ukrainy. Przybyło też sporo gości, przyjaciół Polski i Ukrainy z innych krajów: Austrii, Litwy, Łotwy, Szwajcarii, Szwecji i USA.

Po oficjalnym otwarciu Konferencji i jednocześnie Dni Ukrainy, po południu dnia 11 września, właściwe obrady rozpoczęły się następnego dnia rano sesją poświęconą roli wapnia w regulacjach procesów biologicznych. Sesję tę zdominowały dwa obszerne i świetnie przedstawione wykłady poświęcone pompie wapniowej w błonach plazmatycznych (prof. Ernesto Carafoli, Zurich) oraz jonom wapnia jako czynnika regulującego funkcje wewnątrzkomórkowe (prof. Platon Kostyuk, Kijów). Z tymi też problemami wiązało się 10, kolejno wygłoszonych komunikatów i kilkanaście doniesień plakatowych.

Sesja popołudniowa poświęcona została roli nukleotydów i tlenu azotu w regulacji funkcji i metabolizmu komórek. W problematykę sesji wprowadziły uczestników konferencji dwa niezwykle ekscytujące wykłady o udziale tlenu azotu w: regulacji funkcji śródbłonna naczyń (prof. Ryszard Gryglewski, Kraków) oraz w regulacji funkcji bijącego serca (prof. Tadeusz Maliński, Rochester). Sesję tę, po wysłuchaniu 6-ciu kolejnych doniesień, zamknął wykład wieczorny poświęcony roli integryn w procesie morfogenezy (prof. Reinhard Faessler, Lund). Dalsze obrady tego dnia przeniesiono do znajdującego się nieopodal „Cotton Club”, gdzie, przy dobrym jedzeniu, zimnym piwie i lwowskich piosenkach uczestnicy Konferencji gorąco dyskutowali do późnych godzin wieczornych.

Drugi dzień obrad obejmował szerokie spektrum zagadnień, z których szczególnie uwypuklona została rola cytokin. Osnową stały się wykłady: o roli jaką odgrywa transformujący czynnik wzrostowy beta w procesach chorobowych (prof. Rostislav Stoika, Lwów), o kontrolowanej śmierci monocytów (prof. Juliusz Pryjma, Kraków) i o genetycznie modyfikowanych szczepionkach przeciw-nowotworowych (prof. Andrzej Mackiewicz, Poznań).

Różnorodność poruszanych problemów i możliwość prezentowania odmiennych często spojrzeń na omawiane zagadnienia sprawiły, że Konferencja znacznie przybliżyła do siebie dwa, dotychczas sztucznie rozdzielone, środowiska naukowe. Ukazała też jak ogromne są chęci, ale i możliwości dalszej ich współpracy. Myślę, że Konferencja ta w oczach jej uczestników zostawiła trwałe ślady w myślach i chęć do kontynuowania tych spotkań w latach następnych.

Jan Stępiński

Addendum

Z okazji II Konferencji Parnasowskiej został wydany tom: „Biochemia Kliniczna”, autorstwa Stefana Angielskiego, M. H. Dominiczaka i Z. Jakubowskiego, w ukraińskiej wersji językowej. Podręcznik przetłumaczyli: W. O. Loginskij, O. D. Lucik, L. W. Martyniec i R. S. Stoika.

W nakładzie 1000 egzemplarzy wydała tom firma Perseusz, Sopot, Plac Rybaków 16.

100 egzemplarzy rozdano uczestnikom Konferencji, a pozostałe 900 przekazano firmie Cormay z Warszawy, która sponsoruje i rozprowadza podręcznik na Ukrainie.

KOMUNIKAT ZARZĄDU GŁÓWNEGO

Niniejszym informujemy, że na XVI Walnym Zebraniu Polskiego Towarzystwa Biochemicznego w dniu 16 września 1998 r. w Białymstoku zebrani członkowie Towarzystwa wybrali w głosowaniu tajnym prezesa i wiceprezesa, Komisję Rewizyjną oraz 14 członków Zarządu.

Prezesem Towarzystwa została wybrana prof. dr hab. Jolanta Barańska (Warszawa), a wiceprezesem prof. dr hab. Liliana Konarska (Warszawa). W dniu 16 grudnia 1998 Zarząd Główny ukonstytuował się następująco: Sekretarzem został doc. dr hab. Dariusz Stępkowski (Warszawa), Skarbnikiem – dr Ewa Turska (Łódź), a członkami Prezydium Zarządu zostali: prof. dr hab. Edward Bańkowski (Białystok) i prof. dr hab. Lech Wojtczak (Warszawa). Członkami Zarządu są: dr Teresa Wesołowska (Szczecin), prof. dr hab. Roman Tarnawski (Katowice), dr hab. Piotr Laidler (Kraków), prof. dr hab. Stanisław Bielecki (Łódź), prof. dr hab. Aleksandra Kubicz (Wrocław), prof. dr hab. Teresa Jakubowicz (Lublin), dr hab. Michał Woźniak (Gdańsk), dr hab. Jan Głogowski (Olsztyn), dr Artur Jarmołowski (Poznań).

W skład Komisji Rewizyjnej zostali wybrani:

prof. dr hab. Marta Stryjecka-Zimmer (Lublin) – przewodnicząca oraz prof. dr hab. Barbara Grzelakowska-Sztabert (Warszawa) i prof. dr hab. Jerzy Popinigis (Gdańsk) – członkowie.

Informacja o XXXV Zjeździe Polskiego Towarzystwa Biochemicznego

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

Powołany Komitet Organizacyjny Zjazdu ukonstytuował się w następującym składzie:

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

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

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

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

BioCentrum *Kraków*

Badawcze Laboratoria Usługowe Uniwersytetu Jagiellońskiego

Szanowni Państwo,

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

Oferujemy nasze usługi w zakresie:

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

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

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

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

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

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

Wskazówki dla autorów

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

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

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

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

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

Redakcja prosi Autorów o przestrzeganie następujących wskazówek szczegółowych:

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

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

Strona informacyjna maszynopisu jest nienumerowana, zawiera imiona i nazwiska (a) autora (ów), nazwy, adresy wraz z numerem telefonu zakładów (w języku polskim i angielskim), w których pracują autorzy, adres do korespondencji, nr telefonu

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

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

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

PIŚMIENNICTWO: Wykaz piśmiennictwa obejmuje prace w kolejności ich cytowania w tekście, zaznacza się je liczbami porządkowymi ujętymi w nawiasy kwadratowe, np. [3, 7, 9—26]. Odnosiłki bibliograficzne winny mieć nową uproszczoną formę. Sposób cytowania czasopism (1), monografii (2), rozdziałów z książek jednotomowych (3), rozdziałów z tomów serii opracowanej przez tych samych redaktorów (4), rozdziałów z tomów serii opracowanych przez różnych redaktorów (5) wskazują poniżej podane przykłady:

1. Hildenbrandt GR, Aronson NN (1980) *Biochim Biophys Acta* **631**: 499-502
2. Bostock CJ, Sumner AT (1978) *The Eukaryotic Chromosome*, Elsevier, North-Holland, Amsterdam
3. Norberth T, Piscator M (1979) W: Friberg L, Nordberg GF, Von VB (red) *Handbook on the Toxicology of Metals*. Elsevier, North-Holland, Amsterdam, str. 541-553
4. Delej J, Kesters K (1975) W: Florkin M, Stotz EH (red) *Comprehensive Biochemistry* t 29B. Elsevier, North-Holland Amsterdam, str. 1-77
5. Franks NP, Lieb WR (1981) W: Knight CG (red) *Research Monographs in Cell and Tissue Physiology*, t 7. Elsevier, North-Holland, Amsterdam, str. 243-272

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

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

Redakcja kwartalnika „Postępy Biochemii”
Polskie Towarzystwo Biochemiczne
ul. Pasteura 3,
02-093 Warszawa



Pokwitowanie dla wpłacającego
 zł
 słownie
 wpłacający

.....
 imię, nazwisko, dokładny adres z kodem pocztowym
 na rachunek

Odcinek dla posiadacza rachunku
 zł
 słownie
 wpłacający

.....
 imię, nazwisko, dokładny adres z kodem pocztowym
 na rachunek

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

Polskie Towarzystwo Biochemiczne
02-093 Warszawa, ul. Pasteura 3
 PBK S.A. XIII/O Warszawa
 11101053-1225-2720-3-30

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

stempel

Pobrano opłatę

 zł

.....
 podpis przyjmującego

stempel

Pobrano opłatę

 zł

.....
 podpis przyjmującego



Pokwitowanie dla wpłacającego
 zł
 słownie
 wpłacający

.....
 imię, nazwisko, dokładny adres z kodem pocztowym
 na rachunek

Odcinek dla posiadacza rachunku
 zł
 słownie
 wpłacający

.....
 imię, nazwisko, dokładny adres z kodem pocztowym
 na rachunek

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

Polskie Towarzystwo Biochemiczne
02-093 Warszawa, ul. Pasteura 3
 PKO BP VIII O Warszawa
 10201084-1791-270-201-111

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

stempel

Pobrano opłatę

 zł

.....
 podpis przyjmującego

stempel

Pobrano opłatę

 zł

.....
 podpis przyjmującego

Prenumerata POSTĘPÓW
BIOCHEMII rok 1999
dla nie zrzeszonych w PTBioch 40, — zł
dla członków PTBioch 20, — zł
dla zakładów i bibliotek 70, — zł

Składka P.T.Bioch.
za rok 1999 30, — zł
studenci 10, — zł

