

POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE

# POSTĘPY BIOCHEMII

PL ISSN  
0032-5422

## Advances in Biochemistry

TOM 47, NR 3, 2001 . . . . .

Leptyna – hormon o wielu funkcjach . . . . .	200
Metaloproteazy macierzowe i rak . . . . .	212
Katepsyna D w nowotworach . . . . .	224
Syntazy pseudourydynowe . . . . .	232
Eukariotyczna topoizomeraza I . . . . .	243
Analiza ekspresji genów . . . . .	253
Bioluminescencja bakterii . . . . .	263

**Polskie Towarzystwo Technologów Żywności Oddział Lubelski**  
**Akademia Rolnicza w Lublinie**  
**Agencja Techniki i Technologii w Warszawie**

W czasie trwania interdyscyplinarnej konferencji naukowej, dotyczącej *Nutraceutyków* w dniach 31.01 do 01.02.2002 będą zorganizowane **TARGI TECHNOLOGII I INNOWACJI**. Na targach prezentowane będą sposoby praktycznego wykorzystania substancji i związków chemicznych, zawartych w surowych roślinach, których pozytywne oddziaływanie na przemiany biochemiczne w organizmie człowieka i zwierząt udowodniono naukowo i potwierdzono w praktyce.

**Problematyka targów będzie obejmowała:**

- technologie wytwarzania żywności funkcjonalnej i dodatków do żywności, zawierających substancje aktywne biologicznie,
- innowacyjne produkty, zawierające w swym składzie substancje aktywne biologicznie, możliwe do zastosowania w przemyśle farmaceutycznym, kosmetycznym, w preparatach ochrony roślin lub nadające się do dalszego przetwarzania,
- licencje i patenty obejmujące prawa autorskie,
- prezentację wyników badań rokujących możliwość szybkiego wykorzystania w praktyce.

**Targi skierowane są do:**

- właścicieli małych i średnich przedsiębiorstw i kadry kierowniczej przemysłu spożywczego,
- absolwentów Szkół Wyższych posiadających wiedzę z zakresu chemii organicznej, biochemii, biotechnologii, biofizyki, genetyki, rolnictwa, ogrodnictwa, leśnictwa, zielarstwa, gastronomii,
- asystentów i adiunktów wyższych uczelni, pragnących połączyć pracę naukową z wytwarzaniem najnowszej generacji produktów.

**ORGANIZATORZY TARGÓW TECHNOLOGII I INNOWACJI ZAPEWNIĄJĄ:**

- możliwość zawarcia umowy na rozpoczęcie wytwarzania innowacyjnego wyrobu obejmującej finansowanie lub dofinansowanie inwestycji z wykorzystaniem funduszy instytucji krajowych i zagranicznych, na bardzo korzystnych warunkach,
- uzyskanie bezpłatnej pomocy eksperta i pilotowanie rozpoczęcia produkcji do czasu wejścia firmy na rynek i uzyskanie konkurencyjnej pozycji.

Udział w targach wymaga wcześniejszego zgłoszenia, umożliwiającego otrzymanie katalogu proponowanych praktycznych rozwiązań. Kolejność zgłoszenia będzie decydowała o kolejności zawierania umowy na wykorzystanie określonego rozwiązania prezentowanego na targach. Określone opracowanie praktyczne będzie udostępniane tylko jednemu uczestnikowi.

Zgłoszenia proszę kierować na adres: [ekstrakt@faunus.ar.lublin.pl](mailto:ekstrakt@faunus.ar.lublin.pl)

## WYDAWCA

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

## REDAKTOR SENIOR

Senior Editor  
ZOFIA ZIELIŃSKA  
tel. 831-24-03

## REDAKTOR NACZELNY

Editor in chief  
GRAŻYNA PALAMARCZYK  
tel. 658-47-02

## REDAKTORZY

Editors  
KRYSTYNA GRZELAK  
DANUTA HULANICKA  
ANDRZEJ JERZMANOWSKI  
ANDRZEJ KASPRZAK  
LILIANA KONARSKA  
ANNA SZAKIEL  
ADAM SZEWCZYK

## BIURO REDAKCJI

Editorial office  
SEKRETARZ  
Secretary  
HANNA LASKOWSKA  
poniedziałki, czwartki  
monday—thursday  
14—16  
tel. 659-85-71 w. 441  
SKŁAD I ŁAMANIE  
Typesetting  
MAŁGORZATA BASAJ

## RECENZENCI ZESZYTU

Referees of this issue  
JAN FRONK (Warszawa)  
LUCYNA GRĘBECKA (Warszawa)  
GRAŻYNA JAGURA-BURDZY  
(Warszawa)  
MACIEJ SIEWIŃSKI (Wrocław)

## ADRES REDAKCJI

Address  
REDAKCJA KWARTALNIKA  
„POSTĘPY BIOCHEMII”  
ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa  
e-mail: postepy@nencki.gov.pl

## SPIS TREŚCI

## CONTENTS

Leptyna – hormon o wielu funkcjach Leptin – a multifunctional hormone ANNA NOGALSKA, JULIAN ŚWIERCZYŃSKI . . . . .	200
Metaloproteazy macierzowe i ich rola w progresji nowotwo- rów Matrix metalloproteinases and their role in cancer progression KAROLINA PRZYBYŁOWSKA, JANUSZ BŁASIAK . . . . .	212
Rola katepsyny D w progresji nowotworów The role of cathepsin D in cancer progression MAREK CYBULSKI, HENRYK BERBEĆ . . . . .	224
Syntazy pseudourydynowe – enzymy wprowadzające naj- częstszy w kwasach nukleinowych modyfikowany nukleozyd – pseudourydynę Pseudouridine synthases – enzymes introducing the most abun- dant modified nucleoside in the nucleic acids – the pseudouri- dine JOANNA PIENKOWSKA, ZOFIA SZWEYKOWSKA-KULIŃSKA . . . . .	232
Informacja genetyczna pod kontrolą – rola eukariotycznej to- poizomerazy I Genetic information under control – role of eukaryotic topoiso- merase I RAFAŁ DERLACZ . . . . .	243
Od zróżnicowanej ekspresji genu do klonu cDNA – przegląd metod identyfikacji genów o zmiennym poziomie transkrypcji From differential gene expression to cDNA clone – a review of methods for identification of genes with variable level of tran- scription ANNA LINKIEWICZ, MARCIN FILIPECKI . . . . .	253
Mechanizm, regulacja i rola bioluminescencji bakterii The mechanism, regulation and the role of bacterial biolumine- scence AGATA CZYŻ, GRZEGORZ WĘGRZYN . . . . .	263



## Leptyna — hormon o wielu funkcjach

## Leptin — a multifunctional hormone

ANNA NOGALSKA<sup>1</sup>, JULIAN ŚWIERCZYŃSKI<sup>2</sup>

### Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Biosynteza i molekularny mechanizm działania leptyny
- III. Leptyna a homeostaza przemian energetycznych
  - III-1. Wpływ na pobieranie pokarmu
  - III-2. Wpływ na wydatkowanie energii
  - III-3. Regulacja metabolizmu lipidów
  - III-4. Leptyna i insulina a metabolizm węglowodanów
- IV. Leptyna a dojrzewanie płciowe i rozmnażanie
- V. Inne funkcje leptyny

### Contents

- I. Introduction
- II. Biosynthesis and molecular mechanism of leptin action
- III. Leptin and energy homeostasis
  - III-1. Effect on food intake
  - III-2. Effect on energy expenditure
  - III-3. Regulation of lipids metabolism
  - III-4. Leptin and insulin effects on carbohydrates metabolism
- IV. Leptin and sexual maturation and reproduction
- V. Other functions of leptin

**Wykaz stosowanych skrótów:** CART — transkrypt regulowany przez kokainę i amfetaminę (ang. *cocaine- and amphetamine-regulated transcript*); CRH — hormon uwalniający kortykotropinę (ang. *corticotrophin releasing hormone*); DGK — kinaza diacyloglicerolowa; ERK — kinaza regulowana przez sygnały zewnątrzkomórkowe (ang. *extracellular-signal-regulated kinase*); Fao — linia zróżnicowanych komórek hepatoma; GLP-1 — glukagono-podobny peptyd 1 (ang. *glucagon-like peptide-1*); IRS — substrat kinazy tyrozynowej receptora insuliny (ang. *insulin receptor substrate*); JAK — kinaza tyrozynowa Janusa (ang. *Janus protein kinase*); K<sup>+</sup><sub>ATP</sub> — kanały potasowe regulowane przez ATP; komórki 3T3-L1 — preadipocyty; komórki C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> — komórki włókien mięśniowych; MCH — (ang. *melanin concentrating hormone*); α-MSH — melanotropina (ang. *melanocyte stimulating hormone*); NPY — neuropeptyd Y; NT — neurotensyna; Ob-R — receptor leptyny; PIAS 3 — białkowy inhibitor aktywnych STAT (ang. *protein inhibitor activated STAT*); PKB — kinaza białek B; POMC — proopiomelanokortyna; PPAR-α — receptor aktywowany przez proliferator peroksisomów (ang. *peroxisome proliferator activated receptor-α*); SH2 — domena homologii z kinazami Src 2; SOCS-3-supresor sygnalizacji cytokinowej 3 (ang. *suppressor of cytokine signaling*); STAT — czynniki transkrypcyjne aktywowane w wyniku fosforylacji przez kinazy JAK (ang. *signal transducer and activator of transcription*); T<sub>3</sub> — trijodotyroni-

na; T<sub>4</sub> — tyroksyna; TRH — hormon uwalniający tyreotropinę; TSH — tyreotropina; UCP-1 — białko rozprzegające oksydacyjną fosforylację 1 (ang. *uncoupling protein-1*); UCP-2 — białko rozprzegające oksydacyjną fosforylację 2 (ang. *uncoupling protein-2*);

### I. Wstęp

W 1994 roku po raz pierwszy został odkryty w tkance tłuszczowej myszy i sklonowany gen otyłości (gen *ob*) [1]. Następnie znaleziono go również w tkance tłuszczowej innych ssaków, oraz zidentyfikowano syntetyzowane na matrycy tego genu białko [2-4]. Wydawało się wówczas, że odkrycie to będzie uwieńczeniem poszukiwań genetycznej przyczyny otyłości. Entuzjazm wywołany odkryciem genu *ob* był tym większy, że tkanka tłuszczowa, uważana przez długi czas jedynie za magazyn energii zapasowej, okazała się pełnić także funkcję wydzielniczą, „informując” ośrodkowy układ nerwowy o własnych zasobach energetycznych, wpływając w ten sposób na apetyt oraz aktywność organizmu.

Kilka lat intensywnych badań nad leptyną — produktem genu *ob*, przyniosło wiele nowych, zaskakujących informacji o tym białku, narządach, na które wpływa oraz molekularnych mechanizmach jego działania. Okazało się, że leptyna jest nie tylko „hor-

<sup>1</sup>Mgr, <sup>2</sup>prof. dr hab., Katedra i Zakład Biochemii, Akademia Medyczna w Gdańsku, ul. Dębinki 1, 80-211 Gdańsk, tel. (0-58) 349-14-63

monem sytości” regulującym łaknienie, lecz wpływa na wiele innych procesów fizjologicznych. Odgrywa między innymi rolę czynnika stymulującego dojrzewanie płciowe organizmu [5, 6], hematopoezę [7], angiogenezę [8], wpływa na metabolizm glukozy [9], lipogenezę [10], lipolizę [11, 12], termogenezę [13], kościotworzenie [14] oraz funkcje makrofagów [15] i limfocytów T [16].

## II. Biosynteza i molekularny mechanizm działania leptyny

Leptyna kodowana jest przez gen *ob* położony u myszy w chromosomie 6, a u człowieka w 7 [1, 17]. Gen ten zbudowany jest z 650 tysięcy par zasad i zawiera 3 eksony oddzielone dwoma intronami. Rejon kodujący zawarty jest w eksonach 2 i 3 [17]. W obrębie promotorowym genu *ob* znaleziono kilka sekwencji regulujących jego ekspresję, między innymi: element odpowiedzi na cAMP, na glukokortykoidy, na sterole, a także miejsce wiązania czynnika transkrypcyjnego SP-1 [17]. Ekspresja genu *ob* zachodzi głównie w komórkach żółtej tkanki tłuszczowej (u gryzoni zwanej białą tkanką tłuszczową, ang. *white adipose tissue*) a jej intensywność zależy od lokalizacji tkanki w organizmie. U szczura najniższą eks-

presję tego genu obserwowano w tkance tłuszczowej podskórnej, a najwyższą w adipocytach z okolic nądrzy [4, 18]. Wielkość komórek tłuszczowych także wpływa na biosyntezę leptyny. Duże adipocyty tego samego osobnika syntetyzują większe ilości tego hormonu niż małe komórki [17]. Biosyntezę leptyny stwierdzono także w: brunatnej tkance tłuszczowej [9], komórkach nabłonkowych żołądka [19] i gruczołu piersiowego [17], mięśniach szkieletowych [20], mózgu [21], komórkach gwiaździstych wątroby [22] oraz łożysku i niektórych tkankach płodu [9]. Na syntezę i sekrecję tego białka ma wpływ wiele różnych czynników [9, 17, 23-42]. Najważniejsze z nich przedstawiono w Tabeli 1.

Leptyna jest białkiem o masie cząsteczkowej około 16 kDa [25] zaliczanym do rodziny helikalnych cytokin klasy I [43]. Homologia sekwencji aminokwasowej leptyny człowieka i myszy wynosi ponad 80% [1], a leptyny innych ssaków około 67% [44]. Leptyna syntetyzowana jako propeptyd, po odcięciu 21 aminokwasowej sekwencji sygnałowej [25], wydzielana jest do krwi, gdzie może wiązać się specyficznie z białkami — głównie z rozpuszczalną formą receptora leptyny [45, 46]. Ta forma receptora leptyny jest prawdopodobnie ważnym czynnikiem modulującym całkowite stężenie leptyny we krwi

**Tabela 1**

Czynniki wpływające na syntezę i wydzielanie leptyny.

czynniki	stymulujące	hamujące
<b>hormonalne</b>	insulina glukokortykoidy estrogeny prolaktyna MCH	adrenalina i noradrenalina agonisty adrenoreceptora $\beta_3$ testosteron melatonina hormon uwalniający tyrootropinę hormon wzrostu
<b>cytokiny</b>	czynnik martwicy nowotworu $\alpha$ (myszy <i>in vitro</i> i <i>in vivo</i> ) interleukina 1 $\beta$	czynnik martwicy nowotworu $\alpha$ (ludzkie adipocyty)
<b>dietetyczne</b>	dieta bogata w węglowodany	dieta bogata w tłuszcze głodzenie
<b>leki</b>		Izoproterenol Diazoksyd*(hyperstat) Troglitazon**
<b>fizyczne</b>		ekspozycja zwierząt na zimno ćwiczenia fizyczne
<b>inne</b>	adenozyna kwasy eikozapentanooidowe prostaglandyna E2 ostra infekcja i stany zapalne	cAMP kofeina + karnityna + cholina wolne kwasy tłuszczowe etanol

\*związek tiazydowy o działaniu hipotensyjnym, hamuje wydzielanie insuliny przez komórki B wysp trzustki, zwiększa uwalnianie amin katecholowych. \*\*lek przeciwcukrzycowy, aktywator PPAR $\gamma$ .

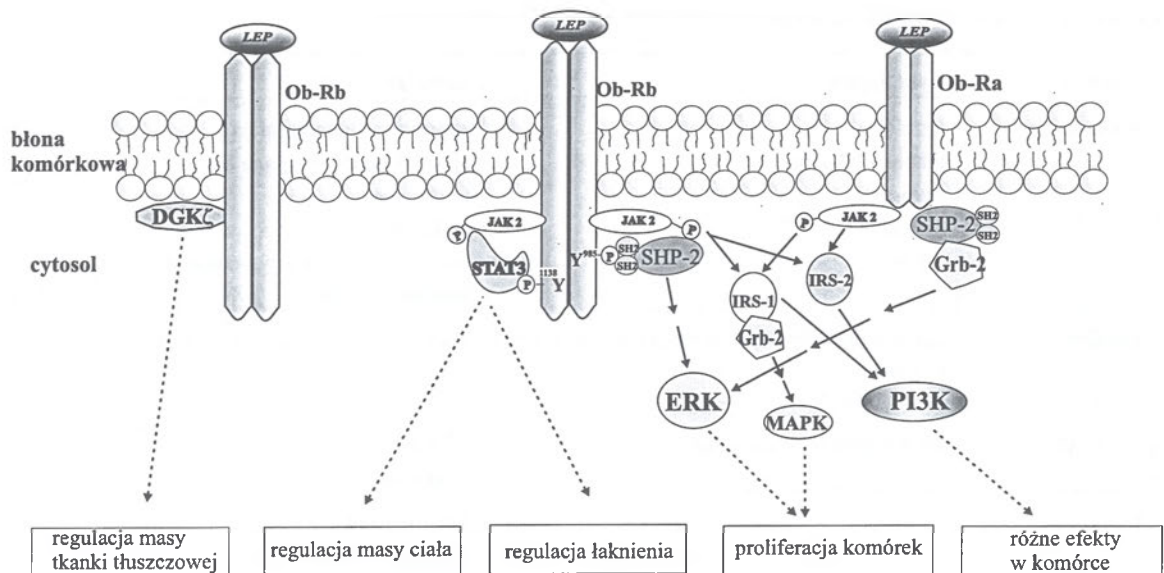
[47]. Stosunek leptyny związanej z białkami do nie-związanej we krwi jest wyższy u ludzi szczupłych niż otyłych [45]. Przypuszcza się również, że wolna i związana z receptorem (rozpuszczalną jego formą) leptyna pełni odmienne funkcje. Wolna leptyna selektywnie kontroluje masę tkanki tłuszczowej, podczas gdy związana z rozpuszczalną formą receptora reguluje wydatkowanie energii [48]. Pewna pula leptyny występuje w postaci związanej w tkankach (w tkankowych miejscach wiążących), co zapewnia utrzymywanie podstawowego stężenia tego hormonu we krwi [17]. W tkance tłuszczowej szczura wykazano istnienie dużych kompartmentów błonowych zawierających leptynę [49]. Wydzielanie jej do krwiobiegu ma charakter pulsacyjny. U ludzi wykazuje wahania dobowe — maksymalne wydzielanie obserwuje się w godzinach nocnych [24, 25]. U zwierząt najwyższe stężenie leptyny we krwi stwierdzono po karmieniu [4, 50]. Czas półtrwania leptyny w krwiobiegu wynosi około 25 minut [51]. W degradacji tego hormonu biorą udział głównie nerki, ale także, chociaż w znacznie mniejszym stopniu i inne narządy — np. wątroba [51].

Leptyna wraz z krwią dociera do narządów docelowych, gdzie wiąże się ze swoistymi receptorami znajdującymi się na powierzchni komórek. Obecność receptorów leptyny wykazano w podwzgórzu i splocie naczyniówkowym — rejonach mózgu zaan-

śnych, komórkach układu krwiotwórczego i na powierzchni makrofagów [7, 15, 27, 46]. Obecność receptorów leptyny w innych, niż mózgowie narządach/tkankach świadczy o tym, że leptyna może wywoływać efekty plejotropowe nie tylko na/i poprzez układ nerwowy, ale też bezpośrednio na poziomie narządów.

Receptor leptyny należy do rodziny receptorów cytokin klasy I [46]. Wyróżnia się kilka izoform tego receptora powstających w wyniku alternatywnego składowania transkryptu genu kodującego receptor leptyny. Najważniejsze z nich, to izoforma długa (Ob-Rb, Ob-R<sub>L</sub>) w skład której wchodzi domena zewnątrzkomórkowa, śródbłonowa oraz zbudowana z 303 reszt aminokwasowych domena wewnątrzkomórkowa, a także forma krótka (Ob-Ra, Ob-R<sub>S</sub>), której domena wewnątrzkomórkowa złożona jest jedynie z 34 aminokwasów [17, 46]. Ponadto istnieje też rozpuszczalna forma receptora leptyny (Ob-Re), strukturalnie odpowiadająca domenie zewnątrzkomórkowej pozostałych izoform [46, 17, 53]. Mechanizm przekazywania informacji, zainicjowany związaniem leptyny z receptorem, różni się w zależności od tkanki/narządu oraz typu zlokalizowanego tam receptora (Ryc. 1).

W podwzgórzu związanie leptyny z zewnątrzkomórkową domeną formy długiej receptora powoduje jego homodimeryzację. Prowadzi to do aktywacji,



Ryc. 1. Schemat przedstawiający proponowane główne drogi przekazywania sygnału przez leptynę za pośrednictwem formy długiej (Ob — Rb) oraz krótkiej (Ob — Ra) receptora leptyny. Efekt działania zależy od tkanki/narządu. Szczegóły opisano w tekście, skróty zgodne z podanymi w wykazie.

gażowanych w kontrolę łaknienia i utrzymywanie masy ciała. Wykryto je także w tkance tłuszczowej, trzustce, wątrobie, nerkach, węzłach chłonnych, jelicie, sercu, śledzionie, płucach, jajnikach, gruczole prostaty, komórkach śródbłonka naczyń krwiono-

wskutek transfosforylacji, związanych z tym receptorem kinaz Janusa 2 (JAK-2) oraz fosforylacji reszt tyrozynowych wewnątrzkomórkowej domeny receptora [46]. Ufosforylowana reszta Tyr<sup>1138</sup> stanowi miejsce przyłączania czynników transkrypcyjnych



STAT 3, które po ufosforylowaniu oddysocjują od kompleksu receptor-JAK-STAT, dimeryzują i przemieszczają się do jądra komórkowego [46, 53]. Białka STAT 3 są syntetyzowane w tych samych neuronach (neuronach jądra łukowatego podwzgórze), w których zachodzi synteza mRNA między innymi neuropeptydu Y i proopiomelanokortyny [17]. Wydaje się więc, że leptyna reguluje transkrypcję tych neuroprzekazników za pośrednictwem STAT 3. Ponadto leptyna wpływa na ekspresję genów *c-fos*, *c-jun* oraz *socs-3*, pozostających pod kontrolą czynników STAT 3 [17, 53]. Jakkolwiek z badań *in vitro* wynika, że leptyna może aktywować większość znanych czynników STAT [54], to wydaje się, że *in vivo* główne znaczenie ma fosforylacja STAT 3 [17]. Jedynie forma długa receptora leptyny zawiera wszystkie motywy strukturalne niezbędne do stymulacji szlaku JAK-STAT. Do ufosforylowanej reszty Tyr<sup>985</sup> receptora leptyny może przyłączać się i ulegać fosforylacji fosfataza tyrozynowa SHP-2 zawierająca dwie domeny SH [53]. Aktywność fosfatazowa tego białka (aczkolwiek jej substraty pozostają niezidentyfikowane) jest niezbędna do aktywacji kinazy ERK w podwzgórzu [55]. Prowadzi to do inicjacji zależnej od tej kinazy transkrypcji genu czynnika transkrypcyjnego Egr-1 oraz genu *c-fos* [53, 55]. Funkcjonuje też alternatywna droga aktywacji kinazy ERK, nie wymagająca fosforylacji receptora Ob-Rb. Fosfataza SHP-2 działa w tym przypadku jako białko adaptorowe białka Grb-2, które inicjuje drogę Ras-Raf-MEK-ERK [53, 55]. Ten szlak również wymaga aktywności fosfatazowej SHP-2 i możliwe jest, że ulega aktywacji za pośrednictwem receptora Ob-R<sub>s</sub> [55]. Wydaje się, że inicjowane przyłączeniem leptyny do receptora drogi przekazywania sygnału z udziałem STAT-3 i SHP-2 działają niezależnie od siebie [55].

W podwzgórzu, z aktywną formą długą receptora leptyny, łączy się związana z błoną kinaza diacyloglicerolowa  $\xi$  (*zeta*) [56]. Po związaniu z receptorem następuje aktywacja tego enzymu. Przypuszcza się, że kinaza ta jest ogniwem pośrednim w systemie regulowania masy tkanki tłuszczowej przez leptynę [56].

Ponadto, za pośrednictwem formy długiej receptora, leptyna rozpoczyna kaskadę zdarzeń prowadzącą do aktywacji kinazy MAP poprzez fosforylację JAK-2, a następnie substratu 1 kinazy tyrozynowej receptora insuliny (IRS-1), z którym łączy się białko Grb-2 [57]. Aktywacja ta może odbywać się również za pośrednictwem formy krótkiej receptora [57]. Fosforylacja JAK-2 poprzez związanie leptyny z formą krótką receptora w komórkach mięśniowych

C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> oraz hepatocytach, prowadzi do fosforylacji substratu 2 kinazy tyrozynowej receptora insuliny (IRS-2) [58]. Ufosforylowany IRS-2 rozpoznawany jest przez podjednostkę p85 3 kinazy fosfatydyloinozytolu (PI3K) [58]. Aktywacja tej kinazy przez leptynę odpowiada za wiele różnych efektów w komórce. W hepatocytach PI3K aktywuje serynowo-treoninową kinazę Akt (PKB), która fosforyluje fosfodiesterazę 3B [59]. Uruchomienie przez leptynę tej kaskady prowadzi do obniżenia, wcześniej podwyższonego wskutek działania glukagonu, stężenia cAMP w tych komórkach [59]. Poprzez 3 kinazę fosfatydyloinozytolu, leptyna hamuje pompę Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> w komórkach 3T3-L1 wzmacniając serynową fosforylację podjednostki katalitycznej tego białka [60]. Podobny mechanizm może leżeć u podstaw regulacyjnego działania leptyny na ciśnienie krwi [60]. Podejrzewa się także, iż leptyna poprzez PI3K wpływa na aktywność kanałów potasowych regulowanych przez ATP, jednak mechanizm działania nie jest jeszcze poznany [61].

Pierwszym wewnątrzkomórkowym etapem sygnalizacji przez insulinę jest także fosforylacja substratów 1 i 2 kinazy tyrozynowej receptora insuliny i w następstwie aktywacja 3 kinazy fosfatydyloinozytolu. To sugeruje, że aktywacja tej drogi przez leptynę powoduje insulino-podobne działanie tego hormonu [58, 62]. W komórkach Fao leptyna wzmaga indukowaną insuliną asocjację IRS-1 z podjednostką p85 PI3K, natomiast osłabia oddziaływanie tej kinazy z IRS-2 [62]. Możliwe, że właśnie w ten sposób leptyna moduluje sygnalizację inicjowaną przez insulinę [62].

Odkryto też szereg postreceptorowych czynników hamujących działanie leptyny. Potencjalnym molekularnym pośrednikiem oporności na leptynę jest supresor sygnalizacji cytokinowej 3 [63]. Białko to domeną SH2 przyłącza się do aktywnych kinaz Janusa i uniemożliwia fosforylację STAT 3 [63]. Ponieważ leptyna stymuluje syntezę tego czynnika wydaje się, że jest on odpowiedzialny za jej autosupresyjne działanie [55, 53]. Kolejnym czynnikiem hamującym działanie leptyny jest fosfataza SHP-2 [63]. Enzym ten defosforylując aktywny receptor leptyny zapobiega indukcji genów poprzez czynniki STAT 3 [63]. SHP-2 może być także pośrednim pozytywnym regulatorem sygnalizacji STAT, ponieważ wiążąc się kompetycyjnie z receptorem leptyny uniemożliwia przyłączanie SOCS-3 [55]. Innym związkiem znoszącym działanie leptyny jest PIAS 3 (białkowy inhibitor aktywnych STAT), który uniemożliwia wiązanie aktywnych czynników STAT do DNA [63].

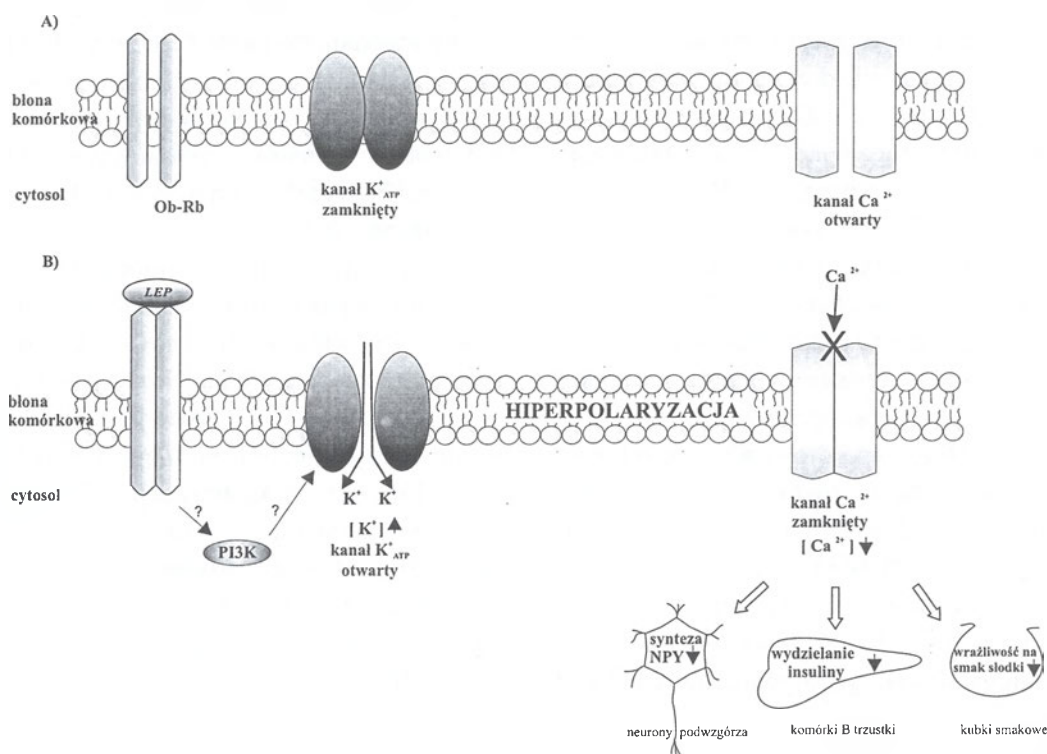
### III. Leptyna a homeostaza przemian energetycznych

#### III-1. Wpływ na pobieranie pokarmu

Pierwsze wyniki doświadczeń wskazywały, że leptyna może być długo poszukiwanym czynnikiem pośredniczącym w przekazywaniu informacji między tkanką tłuszczową a ośrodkowym układem nerwowym, odpowiadającym za kontrolę łaknienia i utrzymywanie stałej masy ciała. Postulowany me-

w w podwzgórzu a w konsekwencji do obniżenia łaknienia i zmniejszenia spożycia pokarmu [4].

Obecnie wiadomo, że mechanizm oddziaływania leptyny na podwzgórze jest znacznie bardziej skomplikowany. Leptyna wpływa na syntezę neuropeptydu Y w podwzgórzu wywołując także hiperpolaryzację neuronów i aktywując kanały potasowe regulowane przez ATP (Ryc. 2) [65]. Ponadto neurony produkujące neuropeptyd Y, nie są jedynym celem działania leptyny w podwzgórzu. Myszy bowiem z nieczynnym genem (ang. *knockout mice*) kodującym

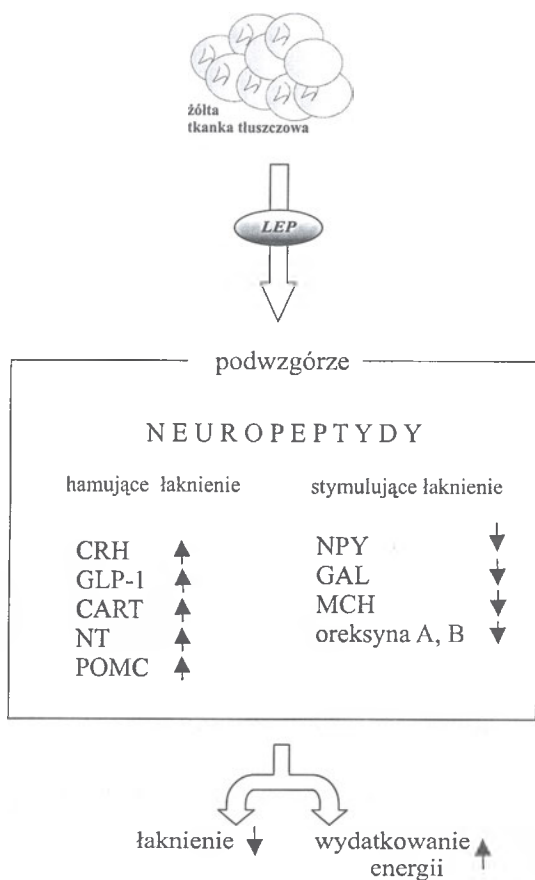


Ryc. 2. Proponowany mechanizm działania leptyny na przepuszczalność błon komórkowych oraz konsekwencje tego działania w różnych komórkach. Szczegóły opisano w tekście. A) Błona komórkowa przed związaniem leptyny do receptora. B) Związanie leptyny z receptorem prowadzi do aktywacji 3-kinazy fosfatydyloinozytolu. W konsekwencji następuje otwarcie kanału potasowego regulowanego przez ATP, napływ jonów K<sup>+</sup> do wnętrza komórki i hiperpolaryzacja błony. Prowadzi to do zamknięcia kanału wapniowego i w konsekwencji do spadku stężenia jonów Ca<sup>2+</sup> w komórce. Wskutek tego procesu następuje w neuronach podwzgórza zahamowanie syntezy neuropeptydu Y, w komórkach B trzustki zahamowanie wydzielania insuliny, a w komórkach smakowych do obniżenia wrażliwości tych komórek na smak słodki. LEP — leptyna, Ob-Rb — izoforma długa receptora leptyny, pozostałe skróty zgodne z podanymi w wykazie. (↓ — hamowanie procesu lub spadek stężenia)

chanizm działania zakładał, że synteza leptyny i wydzielanie jej do krwi przez adipocyty wzrasta, gdy zwiększa się stężenie insuliny, spowodowane poposiłkowym wzrostem stężenia glukozy. Następnie leptyna transportowana jest do podwzgórza [4, 64], gdzie łączy się z receptorem leptyny i uruchamia wewnątrzkomórkową kaskadę przekazywania sygnałów z udziałem kinaz tyrozynowych Janusa (JAK) i czynników transkrypcyjnych (STAT) aktywowanych przez te kinazy [4, 10, 46]. Prowadzi to do zahamowania syntezy i uwalniania neuropeptydu Y

ten neuropeptyd spożywają normalną ilość pokarmu i nie wykazują tendencji do nadmiernego zwiększania masy ciała. Co więcej, podanie takim myszom leptyny redukuje spożycie pokarmu, masę ciała i masę tkanki tłuszczowej [66]. Uważa się, że leptyna modyfikuje zachowania żywieniowe wpływając na ekspresję genów kodujących wiele innych, poza neuropeptydem Y, neuroprzekazników. Hamuje syntezę galaniny, MCH (ang. *melanin concentrating hormone*) [9, 67], oreksyny A i B [68]. Stymuluje zaś produkcję hormonu uwalniającego kortykotropinę [9,





Ryc. 3. Działanie leptyny poprzez wpływ na syntezę neuropeptydów kontrolujących łaknienie i aktywność organizmu. Szczegóły opisano w tekście, skróty zgodne z podanymi w wykazie. (↓ — hamowanie procesu, ↑ — stymulacja procesu)

69], glukagono-podobnego peptydu-1, transkryptu regulowanego przez kokainę i amfetaminę [9], neuropeptydów [67] i produktów proopiomelanokortyny [70]. Oddziaływanie leptyny na neurony podwzgórza syntetyzujące te neuropeptydy, również prowadzi do zahamowania pobierania pokarmu i zwiększenia wydatkowania energii (Ryc. 3).

Hormon melanotropowy — produkt proteolizy proopiomelanokortyny, dodatkowo pośredniczy w oddziaływaniu leptyny na termogenezę oraz na oś podwzgórze — przysadka — tarczyca [71]. Hormony tarczycy są głównym regulatorem homeostazy energetycznej organizmu [72]. W czasie głodzenia spada we krwi stężenie trijodotyroniny, tyroksyny, jak również hormonów regulujących ich biosyntezę i wydzielanie (tyreotropiny i hormonu uwalniającego tyreotropinę) [71]. Stanowi to sygnał do obniżenia metabolizmu organizmu. Wydaje się, że istnieje współzależność pomiędzy stężeniem leptyny, a stężeniem hormonów tarczycy we krwi [72]. Gdy stężenie leptyny jest duże, to oddziałując na jądro łukowate podwzgórza, wywołuje ona wzrost stężenia proopiomelanokortyny a w konsekwencji hormonu melanotropowego [69-74]. Powstający hormon melanotropowy indukuje wydzielanie hormonu uwalniającego tyreotropinę przez jądro przykomorowe,

co prowadzi do zwiększenia produkcji tyreotropiny przez przysadkę i w efekcie do wzrostu stężenia trijodotyroniny i tyroksyny we krwi (Ryc. 4). Obniżenie stężenia leptyny we krwi prowadzi do spadku stężenia hormonów tarczycy i obniżenia metabolizmu [71, 73]. Leptyna może wpływać na wydzielanie hormonów tarczycy także za pośrednictwem neuropeptydu Y, oraz hormonu uwalniającego kortykotropinę. Wskazuje na to istnienie synaptycznych połączeń w obrębie jądra przykomorowego podwzgórza, pomiędzy neuronami produkującymi hormon uwalniający tyreotropinę a neuronami produkującymi neuropeptyd Y i hormon uwalniający kortykotropinę [71, 72]. Nie można wykluczyć także bezpośredniego działania leptyny na komórki produkujące hormon uwalniający tyreotropinę, gdyż w niektórych neuronach jądra przykomorowego wykazano jednoczesną ekspresję receptora leptyny i hormonu uwalniającego tyreotropinę [71, 73, 75]. Leptyna zapobiega obniżeniu poziomu mRNA proTRH także pośrednio, hamując syntezę glukokortykoidów [72, 76]. W procesie tym uczestniczy hormon uwalniający kortykotropinę [77].

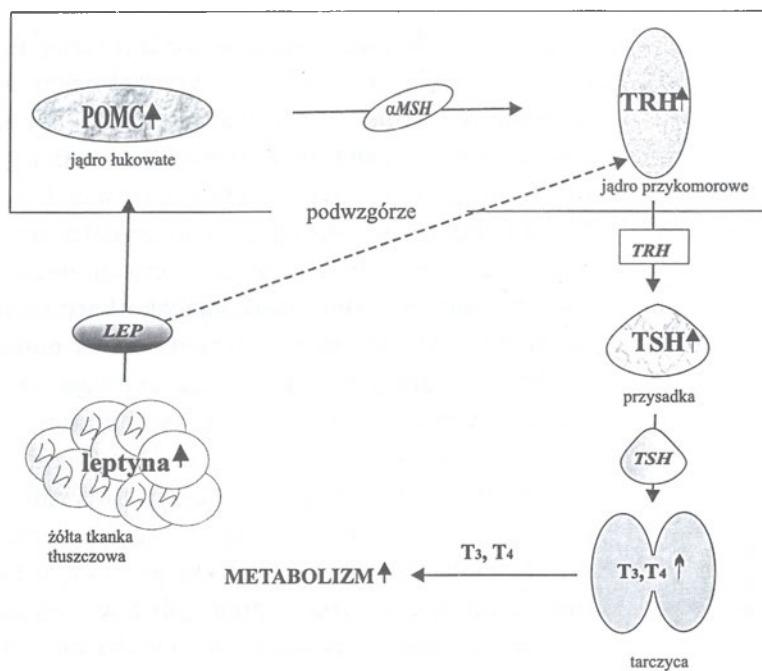
Pośrednikiem działania leptyny na łaknienie może być także interleukina 1. Wykazano korelację między obniżeniem pobierania pokarmu i wzrostem temperatury ciała a zwiększonym stężeniem interleukiny 1β w mózgu szczurów, którym podawano leptynę [78], podczas gdy podanie antagonisty receptora IL-1 znacznie obniżało spożywanie pokarmu [78].

Możliwe jest także, że wpływ leptyny na łaknienie wymaga współdziałania innych czynników pochodzących np. z przewodu pokarmowego. Wykazano, że leptyna współdziała synergistycznie z cholecystokininą, co prowadzi do obniżenia apetytu [79]. Ponadto, po podaniu cholecystokininy obserwowano wzrost stężenia leptyny we krwi, spowodowany prawdopodobnie uwalnianiem zapasów tego hormonu zmagazynowanych w komórkach nabłonka żołądka [19].

Leptyna hamuje także odczuwanie słodkiego smaku przez myszy, co może być kolejnym ogniwem systemu obniżania łaknienia [80]. W komórkach receptorowych smaku, w których receptor leptyny również ulega ekspresji, leptyna podwyższa stężenie jonów potasu, co prowadzi do hiperpolaryzacji błon i obniżenia wrażliwości tych komórek na spożywane cukry (Ryc. 2) [80].

### III-2. Wpływ na wydatkowanie energii

Leptyna kontroluje utrzymanie stałej masy ciała nie tylko poprzez wpływ na pobieranie pokarmu,



Ryc. 4. Hipotetyczny mechanizm działania leptyny na metabolizm organizmu. Szczegóły opisano w tekście. LEP — leptyna, pozostałe skróty zgodne z podanymi w wykazie. (↑ — stymulacja syntezy)

lecz też na aktywność organizmu. Wydaje się, że mechanizm zwiększenia wydatkowania energii związany jest ze wzrostem termogenezy w brunatnej tkance tłuszczowej [81], który wywołuje aktywacja  $\beta_3$ -adrenergicznych receptorów przez noradrenalinę, za pośrednictwem sympatycznego układu nerwowego [13]. Leptyna, aktywując sympatyczny układ nerwowy zwiększa syntezę mitochondrialnego białka rozprzegającego oksydacyjną fosforylację I (UCP-1) [13, 81]. Białko to rozprzegając oksydacyjną fosforylację zapewnia intensywne spalanie substratów energetycznych i produkcję ciepła bez syntezy ATP [13]. Ponadto leptyna stymuluje ekspresję genów lipazy lipoproteinowej [11, 81] i enzymu jabłczanowego [11] w brunatnej tkance tłuszczowej. Zwiększa też ona w tej tkance zużycie glukozy [11, 82], a także lipolizę [11]. Nasilenie tych procesów, a szczególnie biosyntezy lipazy lipoproteinowej, transportu glukozy oraz lipolizy, może być związane ze wzrostem termogenezy w brunatnej tkance tłuszczowej.

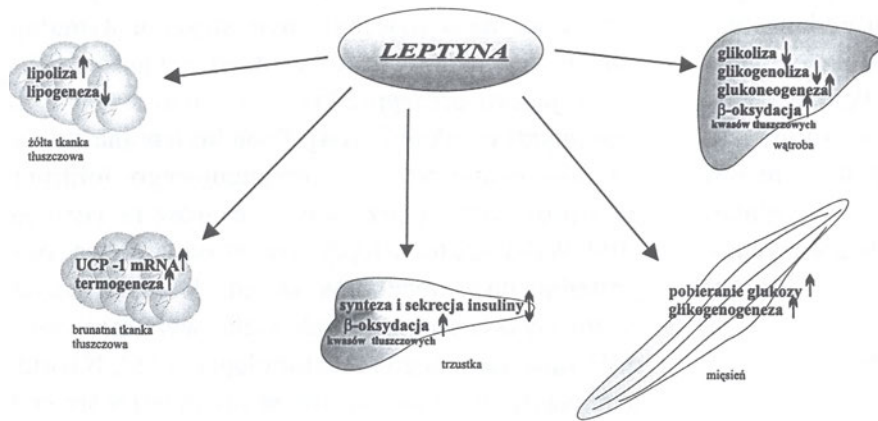
Wykazano, iż leptyna także stymuluje angiogenezę [8]. Możliwe, że indukowany działaniem tego hormonu rozwój naczyń krwionośnych ułatwia utratę ciepła w miejscach zachodzenia intensywnej termogenezy, także w tkance tłuszczowej [8]. Jednak pojawiają się doniesienia, które wykazują, że *in vitro* w adipocytach myszy *ob/ob* leptyna stymuluje ekspresję genu angiopoetyny 2 [83], która zaburza proces formowania naczyń krwionośnych w czasie embriogenezy. Nadekspresja tego białka powinna więc prowadzić raczej do zaniku naczyń krwionośnych (prawdopodobnie w drodze apoptozy komórek śródbłonna) niż ich rozrostu.

### III-3. Regulacja metabolizmu lipidów

Leptyna odgrywa istotną rolę w para- i autokrynej regulacji metabolizmu lipidów. Hamuje bowiem syntezę triacylogliceroli, faworyzując  $\beta$ -oksydację kwasów tłuszczowych w mitochondriach wątroby [84, 85], komórek B trzustki [86], a także mięśni szkieletowych [87] (Ryc. 5).

Leptyna zapobiega nadmiernej akumulacji triacylogliceroli w komórkach różnych narządów, kierując kwasy tłuszczowe do adipocytów [88]. Mutacja receptora leptyny znosi te efekty działania leptyny, co skutkuje znaczącym wzrostem stężenia triacylogliceroli w komórkach tych narządów. Prowadzi to do zaburzeń metabolizmu, a w konsekwencji nawet do apoptozy tych komórek [86, 88].

Leptyna ponadto hamuje syntezę mRNA karboksylazy acetyloCoA [11, 12] i syntazy kwasów tłuszczowych [12], stymuluje zaś ekspresję genów enzymów  $\beta$ -oksydacji, palmitoilotransferazy karnitynowej I, oksydazy acyloCoA oraz PPAR $\alpha$  [12] w izolowanych adipocytach. Hamuje też w nich wbudowywanie octanu do lipidów, wzmagając jego spalanie poprzez stymulację aktywności syntazy cytrynianowej [89]. Leptyna hamuje ekspresję genów syntazy kwasów tłuszczowych oraz enzymu jabłczanowego także *in vivo* [10]. Te wyniki sugerują, że leptyna hamuje lipogenezę i stymuluje lipolizę także w tkance tłuszczowej [10-12, 88]. Towarzyszy temu uwalnianie do krwiobiegu znacznych ilości glicerolu, bez uwalniania wolnych kwasów tłuszczowych. Obserwacje te stały się podstawą przypuszczenia, że uwalniane kwasy tłuszczowe ulegają utlenieniu w adipocytach [12, 86]. Proces ten, a także obserwowana-



Ryc. 5. Ważniejsze efekty metaboliczne wywołane przez leptynę w różnych tkankach i narządach. Szczegóły opisano w tekście (↓ — hamowanie procesu, ↑ — stymulacja procesu)

na po podaniu leptyny apoptoza komórek tkanki tłuszczowej [90], tłumacząc redukcję masy tkanki tłuszczowej [67, 91, 92]. Leptyna powoduje także wzrost poziomu mRNA białka rozprężającego 2 (UCP-2) [89], którego rola w metabolizmie lipidów jest dotąd niewyjaśniona [93].

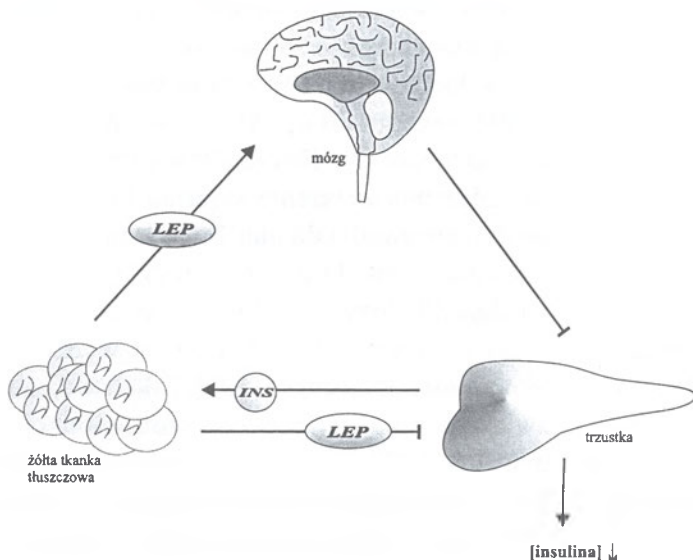
### III-4. Leptyna a insulina i metabolizm cukrów

Leptyna wpływa także na syntezę i sekrecję insuliny, stymulując lub hamując jej wydzielanie *in vitro* przez wyspy Langerhansa trzustki. Zależy to zarówno od stężenia leptyny, jak i glukozy [94, 95]. Takie działanie leptyny może być związane z naprzemiennym otwieraniem i zamykaniem kanałów potasowych regulowanych przez ATP w komórkach B trzustki [94]. Przypuszcza się, że leptyna może aktywować (otwierać) te kanały (podobnie jak w podwzgórzu), co prowadzi do hiperpolaryzacji błony, obniżenia stężenia jonów wapnia w komórkach i zahamowania wydzielania insuliny [96]. Istotną rolę w procesie regulacji kanałów  $K_{ATP}$  odgrywa 3-kinaza fosfatydoinozytolu (Ryc. 2) [61]. Zmniejszone wy-

dzielanie insuliny może być wywołane także hamowaniem przez leptynę aktywności kinazy białek C zależnej od jonów wapnia [97]. Leptyna hamuje też sekrecję insuliny stymulowaną przez glukagono-podobny peptyd 1 [96]. Aktywując kaskadę JAK-STAT w komórkach B trzustki, leptyna hamuje ponadto syntezę mRNA insuliny [95, 96, 98]. Z powyższych danych wynika, że leptyna moduluje wydzielanie insuliny poprzez oddziaływanie na różne procesy komórkowe.

Jednakże insulina stymuluje przyrost masy tkanki tłuszczowej oraz równoległy wzrost stężenia leptyny we krwi [9]. Wzrost zaś stężenia leptyny we krwi prowadzi z kolei do zahamowania syntezy i sekrecji insuliny [99], zapobiega akumulacji kwasów tłuszczowych, a w konsekwencji zwiększaniu masy tkanki tłuszczowej [96]. Wydaje się więc, że można mówić o zwrotnym sprzężeniu niektórych funkcji tkanki tłuszczowej (Ryc. 6).

Leptyna wpływa ponadto na metabolizm cukrów poprzez obniżanie wydzielania insuliny [96], co wpływa na proces uwalniania glukozy z wątroby [62], a hamując aktywność fosforylasy glikogenu



Ryc. 6. Współdziałanie tkanki tłuszczowej, ośrodkowego układu nerwowego i trzustki (LEP — leptyna; INS — insulina). Szczegóły opisano w tekście. (→ — hamowanie procesu, → — stymulacja procesu)



zwiększa, stymulowaną przez insulinę, syntezę glikogenu w tym narządzie [100]. Dożylnie podanie leptyny myszom stymuluje pobieranie glukozy przez mięśnie szkieletowe oraz brunatną tkankę tłuszczową [62, 101]. W przeciwieństwie do insuliny jednak leptyna w wątrobie stymuluje syntezę mRNA karboksykinazy fosfoenolopirogronianowej i glukozy-6-fosfatazy, co prowadzi do wzrostu intensywności glukoneogenezy [84].

#### IV. Leptyna a dojrzewanie płciowe i rozmnażanie

Z dostępnością pożywienia i zapasami energetycznymi organizmu zgromadzonymi w tkance tłuszczowej wiąże się istotna funkcja fizjologiczna — rozmnażanie. Wiadomo, że dojrzewanie płciowe osobnika zależy nie tylko od jego wieku biologicznego, ale również od wzrostu organizmu i masy ciała [5]. Długo poszukiwano czynnika, który „informując” ośrodkowy układ nerwowy o zasobach energetycznych spełniałby rolę sygnału wyzwającego produkcję hormonu uwalniającego gonadotropiny przez przysadkę i tym samym inicjował proces dojrzewania płciowego.

Doświadczenia, w których bezpłodnym, genetycznie otyłym myszom (*ob/ob*) podawano leptynę przyniosły zaskakujące rezultaty. Okazało się, że zwierzęta te nie tylko chudły, ale również odzyskiwały płodność [6, 102]. Ponadto stwierdzono, że podawanie leptyny niedojrzałym płciowo myszom powodowało przyspieszenie dojrzewania płciowego [103]. Wyniki te wskazują, że leptyna może przyspieszać proces dojrzewania płciowego [7, 103]. Stężenie leptyny we krwi rośnie w pierwszych miesiącach życia zwierząt [10]. Minimalne stężenie tego hormonu niezbędne do zainicjowania dojrzewania u szczura wynosi 700 pg/ml [103]. Uważa się więc, że molekularnym pośrednikiem kontrolującym funkcje rozrodcze organizmu może być leptyna [15].

Problemem wciąż otwartym pozostaje mechanizm działania leptyny na proces osiągnięcia dojrzałości płciowej. Jak się wydaje, celem działania tego białka może być zarówno podwzgórze, przysadka jak i/lub gonady. Możliwe, że białko to wpływa na funkcje rozrodcze organizmu aktywując lub hamując syntezę i sekrecję różnych neuropeptydów podwzgórza, takich jak: neuropeptyd Y, hormon uwalniający kortykotropinę, galanina, somatostatyna czy produkty genu proopiomelanokortyny [6]. Neuropeptydy te mogą wpływać na sekrecję hormonu uwalniającego gonadotropiny [6, 104]. Zwłaszcza neuropeptyd Y (oprócz wpływu na łaknienie) reguluje sekrecję hor-

monu uwalniającego hormon luteinizujący [103, 105]. Leptyna w fizjologicznym stężeniu stymuluje indukowane przez steroidy wydzielanie hormonu luteinizującego oraz prolaktyny u samic szczurów z usuniętymi jajnikami [104]. Ponadto leptyna stymuluje uwalnianie hormonu luteinizującego, folitropiny i prolaktyny z przysadki szczurów *in vitro* [6, 105]. Wskazuje to, iż leptyna może oddziaływać bezpośrednio na przysadkę. W narządach układu rozrodczego myszy, szczura i człowieka wykazano obecność funkcjonalnego receptora leptyny [6]. Narządy te mogą być więc potencjalnym celem bezpośredniego działania tego hormonu. Leptyna reguluje ekspresję genu  $17\alpha$ -hydroksylazy, jednego z enzymów odpowiedzialnych między innymi za syntezę estradiolu i testosteronu. Moduluje ona *in vivo* indukowaną przez hormon luteinizujący syntezę estradiolu w jajnikach [6], zaś działając na jądra szczura *in vitro*, hamuje wydzielanie testosteronu [105].

Leptyna niezbędna jest także do utrzymania zdolności do rozrodu. Zaobserwowano różnice w stężeniu leptyny w surowicy krwi kobiet i mężczyzn o tym samym współczynniku masy ciała. U kobiet jest ono 2-3 razy wyższe [101]. Ponadto wykazano fizjologiczne fluktuacje stężenia leptyny w ciągu cyklu miesięczkowego — obniżenie we wczesnej fazie folikularnej, szczyt przedowulacyjny i podwyższony poziom w fazie lutealnej cyklu [101]. Zmiany te prawdopodobnie związane są ze zmianami stężenia hormonów steroidowych. Obserwuje się także różnice w poziomie leptyny we krwi kobiet przed i po menopauzie; jednak kobiety, u których proces klimakterium już się zakończył mają w dalszym ciągu wyższy poziom tego hormonu niż mężczyźni [101].

W czasie ciąży zaobserwowano podwyższenie stężenia leptyny we krwi [101, 106]. Być może ma to związek nie tylko z regulacją łaknienia i termogenezy, lecz także z ułatwieniem maksymalnego wykorzystania energii z  $\beta$ -oksydacji kwasów tłuszczowych, które w tym okresie w macicy są głównym źródłem energii [106]. Wydaje się, że w czasie ciąży zachodzi zjawisko fizjologicznej oporności na leptynę, gdyż podwyższenie stężenia tego hormonu we krwi nie prowadzi do obniżenia łaknienia oraz przyrostu masy ciała [106]. Po porodzie i w czasie laktacji stężenie leptyny we krwi ulega znacznemu obniżeniu i ma związek z obniżeniem wydzielania hormonu luteinizującego [107]. Możliwe, że jest to związane z opóźnieniem powrotu płodności u karmiących [107]. Co ciekawe, w okresie laktacji zwiększa się apetyt, oraz obserwuje się wzrost ilości mRNA oraz białka neuropeptydu Y u zwierząt [107].

Niewykluczone jest także, że wpływ leptyny na funkcje rozrodcze organizmu jest skutkiem jej oddziaływań na dostępność substratów energetycznych, takich jak glukoza, czy kwasy tłuszczowe [6]. Wydaje się, że spalanie tych związków reguluje cykl estrogenowy. Dostępność glukozy może być regulatorem wydzielania LH [5]. Potwierdzeniem tej hipotezy mogą być doświadczenia na chomikach syryjskich. Wynika z nich, że zahamowanie syntezy estrogenów wywołane głodem zwierząt, ulega zniesieniu po podaniu leptyny. Efekt ten jednak nie występuje, gdy zwierzętom dodatkowo podaje się 2-deoksyglukozę hamującą metabolizm glukozy [108].

Wielokierunkowy wpływ leptyny na metabolizm utrudnia odróżnienie jej pierwotnych i wtórnych efektów. Wydaje się, że leptyna jest czynnikiem niezbędnym, ale nie jedynym, do zapoczątkowania procesu dojrzewania płciowego osobników, a później do utrzymania ich zdolności do rozrodu. Jej rola mogłaby polegać na „informowaniu” ośrodkowego układu nerwowego o zasobach energetycznych ustroju. Spadek stężenia tego hormonu we krwi (np. w czasie głodu), wraz z ograniczeniem spalania metabolitów, mógłby być sygnałem do oszczędzania zasobów energetycznych i „wyłączenia” mniej istotnych dla przeżycia układów [109].

## V. Inne funkcje leptyny

Oprócz oddziaływania na opisane powyżej procesy, leptyna wpływa na utrzymanie homeostazy ciśnienia krwi [110]. Indukuje proliferację i różnicowanie komórek układu krwiotwórczego [7]. Wywołuje także wzrost proliferacji komórek śluzowych żołądka i w ten sposób odgrywa rolę gastroprotekcijną [111]. Oddziałuje też na komórki układu odpornościowego. Aktywuje makrofagi i monocyty, reguluje fagocytozę i indukuje ekspresję cytokin (interleukiny 6 i 12, czynnika martwicy nowotworu  $\alpha$ ) w tych komórkach [15, 109]. Wywiera też specyficzny wpływ na odpowiedź limfocytów T. Indukuje proliferację komórek T naiwnych (ang. *T-naive*), hamuje zaś proliferację limfocytów pamięci immunologicznej (ang. *T-memory*) [15]. Leptyna osłabia odpowiedź na stres hamując uwalnianie kortyzolu przez nadnercza [76]. W warunkach fizjologicznych hamując uwalnianie somatostatyny stymuluje wydzielanie hormonu wzrostu [112].

W poznawaniu mechanizmów działania leptyny i jej fizjologicznej roli ostatnie słowo nie zostało jeszcze powiedziane. Pozostaje mieć nadzieję, że dalsze lata badań nad tym interesującym białkiem dopro-

wadzą do zrozumienia jego kompleksowego działania oraz opracowania strategii leczenia chorób spowodowanych zaburzeniami prawidłowego funkcjonowania tego hormonu.

## Podziękowanie

Autorzy dziękują Panu Prof. dr hab. Mariuszowi M. Żydowo z Katedry i Zakładu Biochemii AMG za cenne wskazówki w czasie redagowania pracy. Praca została wykonana w ramach działalności statutowej (St-41) Katedry i Zakładu Biochemii Akademii Medycznej w Gdańsku i Badań Własnych W-934, oraz realizacji projektu badawczego KBN 6 P05A 04021.

Artykuł otrzymano 11 września 2000 r.

Zaakceptowano do druku 10 września 2001 r.

## Piśmiennictwo

1. Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM (1994) *Nature (Lond)* **372**: 425-432
2. Murakami T, Shima K (1995) *Biochem Biophys Res Commun* **209**: 944-952
3. Isse N, Ogawa Y, Tamura N, Masuzaki H, Mori K, Okazaki T, Satoh N, Shimoto M, Yoshimasa Y, Nishi S, Hosoda K, Inazawa J, Nakao K (1995) *J Biol Chem* **270**: 27728-27733
4. Świerczyński J, Kochan Z, Karbowska J (1997) *Post Bioch* **43** (3): 174-182
5. Foster D L, Nagatani S (1999) *Biol Reprod* **60**: 205-215
6. Cunningham M J, Clifton D K, Steiner R A (1999) *Biol Reprod* **60**: 216-222
7. Gainsford T, Willson T A, Metcalf D, Handman E, McFarlane C, Ng A, Nicola N A, Alexander W S, Hilton D J (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci.* **93**: 14564-14568
8. Sierra-Honigmann M R, Nath A K, Murakami C, Garcia-Cardena Z A G, Papapetropoulos A, Sessa W C, Madge L A, Schechner J S, Schwab B M B, Polverini P J, Flores-Riveros J R (1998) *Science* **281**: 1683-1686
9. Trayhurn P, Hoggard N, Mercer J G, Rayner D V (1999) *Int J Obesity* **23 Suppl 1**: 22-28
10. Nogalska A, Świerczyński J (2001) *Biochim Biophys Acta* **1533**(1): 73-80
11. Siegrist-Kaiser C A, Pauli V, Juge-Aubry C E, Boss O, Pernin A, Chin W W, Cusin I, Rohner-Jeanrenaud F, Burger A G, Zapf J, Meier C A (1997) *J Clin Invest* **100**: 2858-2864
12. Wang M, Lee Y, Unger R H (1999) *J Biol Chem* **275**: 17541-17544
13. Scarpace P J, Matheny M, Pollock B H, Tümer N (1997) *Am J Physiol* **273**: E226-E230
14. Marie P, Debais F, Cohen-Solal M, de Vernejoul M C (2000) *Joint Bone Spine* **67**: 150-156
15. Loffreda S, Yang S Q, Lin H Z, Karp C L, Bregman M L, Wang D J, Klein A S, Bulkeley G B, Bao C, Noble P W, Lane M D, Diehl A M (1998) *FASEB J* **12**: 57-65
16. Lord G M, Matarese G, Howard J K, Baker R J, Bloom S R, Lechler R I (1998) *Nature (Lond)* **394**: 897-901
17. Ahima S R, Flier J S (2000) *Annu. Rev. Physiol* **62**: 413-437
18. Zheng D, Jones J P, Upsala J, Dohm G L (1996) *Biochem Biophys Res Commun* **218**: 434-437
19. Bado A, Levasseur S, Attoub S, Kermorgant S, Laigneau J, Bortoluzzi M, Moizo L, Lohy T, Guerre-Millo M,



- Le Marchand-Brustel Y, Lewin M J M (1998) *Nature (Lond)* **394**: 790-793
20. Wang J, Liu R, Hawkins M, Barzilai N, Rossetti L (1998) *Nature (Lond)* **393**: 684-688
  21. Esler M, Vaz M, Collier G, Nestel P, Jennings G, Kaye D, Seals D, Lambert G (1998) *Lancet* **351**: 879
  22. Roden M, Anderwald C, Furnsinn C, Waldhause W, Lohninger A (2000) *Hepatology* **32**: 1045-1049
  23. Hardie L J, Rayner D V, Holmes S, Trayhurn P (1996) *Biochem Biophys Res Commun* **223**: 660-665
  24. Coleman R A, Herrmann T S (1999) *Diabetologia* **42**: 639-646
  25. Tritos N A, Mantzoros C S (1997) *Diabetologia* **40**: 1371-1379
  26. Jenkins A B, Markowicz T P, Fleury A, Campbell L V (1997) *Diabetologia* **140**: 348-351
  27. Shimizu H, Shimomura Y, Nakanishi Y, Futawatari T, Ohtani K, Sato N, Mori M (1997) *J Endocrinol* **154**: 285-292
  28. Kristensen K, Pedersen S B, Richelsen B (1999) *Biochem Biophys Res Commun* **259**: 624-630
  29. Finck B N, Johnson R W (2000) *Am J Physiol* **272**: R537-543
  30. Fawcett R L, Waechter A S, Williams L B, Zhang P, Louie R, Jones R, Inman M, Huse J, Considine R V (2000) *J Clin Endocrinol Metab* **85**: 530-535
  31. Fain J N, Cowan G S Jr, Buffington C, Li J, Pouncey L, Bahouth S W (2000) *Metabolism* **49**: 804-809
  32. Strandridge M, Alemzadeh R, Zemelm, Koontz J, Moustaid-Moussa N (2000) *FASEB J* **14**: 455-460
  33. Shintani M, Nishimura H, Akamizu T, Yonemitsu S, Masuzaki H, Ogawa Y, Hosoda K, Inoue G, Yoshimasa Y, Nakao K (1999) *Metabolism* **48**: 1570-1574
  34. Wolden-Hanson T, Mitton D R, McCants R L, Yellon S M, Wilkinson C W, Matsumoto A M, Rasmundssen D D (2000) *Endocrinology* **141**: 487-497
  35. Gualillo O, Lago F, Garcia M, Menendez C, Senaris R, Casanueva F F, Dieguez C (1999) *Endocrinology* **140**: 5149-5153
  36. Elimam A, Lindgren A C, Norgren S, Kamela A, Skwirut C, Bang P, Marcus C (1999) *Horm Res* **52**: 66-72
  37. Murata M, Kaji H, Takahashi Y, Iida K, Mizuno I, Okimura Y, Abe H, Chihara K (2000) *Biochem Biophys Res Commun* **270**: 343-348
  38. Rice A M, Fain J N, Rivkees S A (2000) *Endocrinology* **141**: 1442-1445
  39. Dees W L, Dissen G A, Hiney J K, Lara F, Ojeda S R (2000) *Endocrinology* **141**: 1325-1331
  40. Shintani M, Nishimura H, Yonemitsu S, Masuzaki H, Ogawa Y, Hosoda K, Inoue G, Yoshimasa Y, Nakao K (2000) *Metabolism* **49**: 326-330
  41. Hongu N, Sachand S (2000) *J Nutr* **130**: 152-157
  42. Bradley R L, Kokkotou E G, Maratos-Flier E, Cheatham B (2000) *Diabetes* **49**: 1073-1077
  43. Fröhnbeck G, Jebb S A, Prentice A M (1998) *Clin Physiol* **18**: 399-419
  44. Zhang F, Basinski M B, Beals J M, Briggs S L, Churgay L M, Clawson D K, DiMarchi R D, Furman T C, Hale J E, Hsiung H M, Schoner B E, Smith D P, Zhang X Y, Wery J, Schevitz R W (1997) *Nature (Lond)* **387**: 206-209
  45. Sinha M K, Opentanova I, Ohannesian J P, Kolaczynski J W, Heiman M L, Hale J, Becker G W, Bowser R R, Stephens T W, Caro J F (1996) *J Clin Invest* **98**: 1277-1282
  46. Pankiewicz A, Świerczyński J (1999) *Post Bioch* **45**: 218-225
  47. Huang L, Wang Z, Li C (2001) *J Biol Chem* **276**: 6343-6349
  48. Brabant G, Horn R, Von Zur Muhlen A, Mayr B, Wurster U, Heidenreich F, Schnabel D, Gruters-Kieslich A, Zimmermann-Belsing T, Feldt-Rasmussen U (2000) *Diabetologia* **43**: 438-442
  49. Roh C, Thodios G, Farmer S R, Kandrak V (2000) *Am J Physiol Endocrinol Metab* **279**: E893-899
  50. Fröhnbeck G, Gomez-Ambrosi J, Martinez J A (1999) *Physiol Res* **48**: 189-195
  51. Garibotto G, Russo R, Franceschini R, Robaudo C, Saffioti S, Sofia A, Rolandi E, Deferrari G, Barreca T (1998) *Biochem Biophys Res Commun* **247**: 504-509
  52. Sharma K, Considine R V (1998) *Kidney Int* **53**: 1483-1487
  53. Banks A S, Davis S M, Bates S H, Myers M. (2000) *J Biol. Chem* **275**: 14563-14572
  54. Takayashi Y, Okimura Y, Mizuno I, Iida K, Takahashi T, Kaji H, Abe H, Chihara K (1997) *J Biol. Chem* **272**: 12897-12900
  55. Björbæk C, Buchholz R M, Davis S M, Bates S H, Pierroz D D, Gu H, Neel B G, Myers M G, Flier J S (1997) *J Biol Chem* **272**: 12897-12900
  56. Liu Z, Chang G-Q, Leibowitz S F (2001) *J Biol Chem* **276**: 5900-5907
  57. Björbæk C, Uotani S, D'Alva B, Flier J S (1997) *J Biol Chem* **272**: 32686-32695
  58. Keller M, Koch M, Metzinger E, Mushack J, Capp E, Haring H U (1997) *Diabetologia* **40**: 1358-1362
  59. Zhao A Z, Shinohara M M, Huang D, Shimizu M, Eldar-Finkelman H, Krebs E G, Beavo J A, Bornfeldt K E (2000) *J Biol Chem* **275**: 11348-11354
  60. Sweeney G, Niu W, Kanani R, Klip A (2000) *Endocrinology* **141**: 1277-1280
  61. Harvey J, McKay N G, Walker K S, VanderKaay J, Downes C P, Ashford M L J (2000) *J Biol Chem* **275**: 4660-4669
  62. Szanto I, Kahn C (2000) *Proc Natl Acad Sci* **97**: 2355-2360
  63. Wang Z, Zhou Y-T, Kakuma T, Lee Y, Kalra S P, Kalra P S, Pan W, Unger R H (2000) *Biochem Biophys Res Commun* **277**: 20-26
  64. Wang Q, Bing C, Al-Barazanji K, Mossakowska D E, Wang X, McBay D L, Neville W A, Taddayon M, Pickavance L, Dryden S, Thomas M E A, McHale M T, Gloyer I S, Wilson S, Buckingham R, Arch J R S, Trayhurn P, Williams G (1997) *Diabetes* **46**: 335-341
  65. Spanswick D, Smith M A, Groopie V E, Logan S D, Ashford M L (1997) *Nature (Lond)* **390**: 521-525
  66. Erickson J C, Clegg K E, Palmiter R D (1996) *Nature (Lond)* **381**: 415-418
  67. Saha A (1998) *Endocrinology* **139**: 795-798
  68. Lopez M, Seoane L, Garcia M, Lago F, Casanueva F F, SeZaris R, Dieguez C (2000) *Biochem Biophys Res Commun* **269**: 41-45
  69. Schwartz M W, Seeley R J, Campfield L A, Burn P, Baskin D G (1996) *J Clin Invest* **98**: 1101-1106
  70. Mizuno T M, Kleopoulos S P, Bergen H T, Roberts J L, Priest C A, Mobbs C V (1998) *Diabetes* **47**: 294-297
  71. Kim M S, Small C J, Stanley S A, Morgan D G A, Seal L J, Kong W M, Edwards C M B, Abusnana S, Sunter D, Ghattai M A, Bloom S R (2000) *J Clin Invest* **105**: 1005-1009
  72. Orban Z, Bornstein S R, Chrousos G P (1998) *Horm Metab Res* **30**: 231-235
  73. Flier J S, Harris M, Hollenberg A N (2000) *J Clin Invest* **105**: 859-861
  74. Harold J A, Widdowson P S, Williams G (1999) *Diabetes* **48**: 267-271
  75. Nilni E A, Vaslet C, Harris M, Hollenberg A, Björbak C, Flier J S (2000) *J Biol Chem* **275**: 36124-36133
  76. Bornstein S R, Uhlmann K, Haidan A, Ehrhart-Bornstein M, Scherbaum W A (1997) *Diabetes* **46**: 1235-1238
  77. Heiman M L, Ahima R S, Craft L S, Schoner B, Stephens T W, Flier J S (1997) *Endocrinology* **138**: 3859-3863
  78. Lushigi N, Gardner J D, Rushforth D A, Loudon A S, Rothwell J N (1999) *Proc Natl Acad Sci* **96**: 7047-7052
  79. Barrachina M D, Martinez V, Wang L, Wei J Y, Tache Y (1997) *Proc Natl Acad Science* **94**: 10455-10460
  80. Kawai K, Sugimoto K, Nakashima K, Miura H, Ninomiya Y (2000) *Proc Natl Acad Sci* **97**: 11044-11049
  81. Scarpace P J, Matheny M (1998) *Am J Physiol* **275**: E259-E264
  82. Minokoshi Y, Haque M S, Shimazu T (1999) *Diabetes* **48**: 287-291



83. Cohen B, Barkan D, Levy Y, Goldberg I, Fridman E, Kopolovic J, Rubenstein M, (2001) *J Biol Chem* **276**: 7697-7700
84. Liu L, Karkanas GB, Morales JC, Hawkins M, Barzilai N, Wang J, Rossetti L (1998) *J Biol Chem* **273**: 31160-31167
85. Rossetti L, Massillon D, Barzilai N, Vuguin P, Chen W, Hawkins M, Wu J, Wang J (1997) *J Biol Chem* **272**: 27758-27763
86. Shimabukuro M, Koyama K, Chen G, Wang M, Trieu F, Lee Y, Newgard CB, Unger RH (1997) *Proc Natl Acad Sci* **94**: 4637-4641
87. Muoio DM, Dohm GL, Tapscott EB, Coleman RA (1999) *Am J Physiol* **276**: E913-E921
88. Unger RH, Zhou Y, Orci L (1999) *Proc Natl Acad Sci* **96**: 2327-2332
89. Ceddia RB, William WN, Lima FB, Flandin P, Curi R, Giacobino JP (2000) *Eur J Biochem* **267**: 5952-5957
90. Qian H, Azain MJ, Compton MM, Hartzell DL, Hausman GJ, Baile CA (1998) *Endocrinology* **139**: 791-795
91. Ceddia RB, William WN Jr, Lima FB, Curi R (1998) *J Endocrinol* **158**: R7-R9
92. Barzilai N, Wang J, Massillon D, Vuguin P, Hawkins M, Rossetti L (1997) *J Clin Invest* **100**: 3105-3110
93. Boss O, Hagen T, Lowell BB (2000) *Diabetes* **49**: 143-153
94. Ceddia RB, William WN Jr, Carpinelli AR, Curi R (1999) *Gen Pharmacol* **32**: 233-237
95. Emilsson V, Liu Y, Cawthorne MA, Morton NM, Davenport M (1997) *Diabetes* **46**: 313-316
96. Kieffer TJ, Habener JF (2000) *Am J Physiol* **278**: E1-E14
97. Okuma M, Okuma K, York DA (1998) *Diabetes* **47**: 219-223
98. Pallet AL, Morton NM, Cawthorne MA, Emilsson V (1997) *Biochem Biophys Res Commun* **238**: 267-270
99. Frühbeck G, Salvador J (2000) *Diabetologia* **43**: 3-12
100. Aiston S, Agius L (1999) *Diabetes* **48**: 15-20
101. Wauters M, Considine RY, Van Gaal LF (2000) *Eur J Endocrinol* **143**: 293-311
102. Mounzih K, Lu R, Chebab FF (1997) *Endocrinology* **138**: 1190-1193
103. Kiess W, Blum WF, Aubert ML (1998) *Eur J Endocrinol* **138**: 26-29
104. Watanobe H, Suda T, Wikberg JES, Schiöth HB (1999) *Biochem Biophys Res Commun* **263**: 162-165
105. Koshaka A, Watanobe H, Kakizaki Y, Habu S, Suda T (1999) *Biochem Biophys Res Commun* **254**: 578-581
106. Chien EK, Hara M, Rouard M, Yano H, Philippe M, Polonsky KS, Bell GI (1997) *Biochem Biophys Res Commun* **237**: 476-480
107. Brogan RS, Mitchell SE, Trayhurn P, Smith MS (1999) *Endocrinology* **140**: 2621-2627
108. Schneider JE, Goldman MD, Tang S, Bean B, Ji H, Friedman MI (1998) *Horm Behav* **33**: 217-228
109. Lembo G, Vecchione C, Fratta L, Marino G, Trimarco V, d'Amati G, Trimarco B (2000) *Diabetes* **49**: 203-207
110. Boloumie A, Markumo T, Lafontan M, Busse R (1990) *FASEB J* **13**: 1231-1238
111. Schneider R, Bornstei SR, Chrousos GP, Boxberger S, Ehninger G, Breidert M. (2001) *Horm Metab Res* **33**: 1-6
112. Cocchi D, De Gennaro Colonna V, Bagnasco M, Bonucci D, Muller EE (1999) *J Endocrinol* **162**: 95-99

# Metaloproteazy macierzowe i ich rola w progresji nowotworów

## Matrix metalloproteinases and their role in cancer progression

KAROLINA PRZYBYŁOWSKA<sup>1</sup>, JANUSZ BŁASIAK<sup>2</sup>

### Spis treści:

- I. Wprowadzenie
- II. Struktura metaloproteaz macierzowych
- III. Geny metaloproteaz macierzowych
- IV. Regulacja aktywności enzymatycznej metaloproteaz macierzowych
  - IV-1. Regulacja ekspresji genów metaloproteaz macierzowych
  - IV-2. Aktywacja zymogenów metaloproteaz macierzowych
  - IV-3. Tkankowe inhibitory metaloproteaz macierzowych
- V. Rola metaloproteaz macierzowych w procesach fizjologicznych
- VI. Znaczenie metaloproteaz macierzowych we wzroście i progresji nowotworów
  - VI-1. Znaczenie diagnostyczne i prognostyczne w nowotworach złośliwych
  - VI-2. Wzrost guzów nowotworowych
  - VI-3. Angiogeneza w nowotworach złośliwych
  - VI-4. Inwazja i metastaza
- VII. Hamowanie aktywności metaloproteaz macierzowych w terapii przeciwnowotworowej
  - VII-1. Syntetyczne inhibitory metaloproteaz macierzowych
  - VII-2. Terapia genowa
- VIII. Uwagi końcowe

### Contents:

- I. Introduction
- II. Structure of matrix metalloproteinases
- III. Matrix metalloproteinases genes
- IV. Regulation of matrix metalloproteinases enzymatic activity
  - IV-1. Regulation of matrix metalloproteinases genes expression
  - IV-2. Activation of the zymogenes of matrix metalloproteinases
  - IV-3. Tissue inhibitors of matrix metalloproteinase
- V. Role of matrix metalloproteinases in physiological processes
- VI. Implications of matrix metalloproteinases for tumor growth and progression
  - VI-1. Diagnostic and prognostic potential in cancer
  - VI-2. Tumor growth
  - VI-3. Angiogenesis in cancer
  - VI-4. Invasion and metastasis
- VII. Inhibition activity of matrix metalloproteinases in anti-cancer therapy
  - VII-1. Synthetic inhibitors of matrix metalloproteinase
  - VII-2. Gene therapy
- VIII. Concluding remarks

**Wykaz stosowanych skrótów:** AP-1, 2 — czynniki transkrypcyjne; ECM — macierz zewnątrzkomórkowa; EGF — naskórkowy czynnik wzrostu; Egr-1 — czynnik transkrypcyjny; Ets — czynnik transkrypcyjny; FGF — czynnik wzrostu fibroblastów; MMP — metaloproteazy macierzowe; MT-MMP — transbłonowe metaloproteazy macierzowe; PAI-1, 2 — inhibitory aktywatorów plazminogenu typu 1 i 2; PEA3 — sekwencja wiążąca czynnik transkrypcyjny Ets; PDGF — czynnik wzrostu płytek krwi; PEX — C-końcowy fragment MMP-2; Sp-1 — czynnik transkrypcyjny; TIMP — tkankowy inhibitor metaloproteaz macierzowych; TGFβ — transformujący czynnik wzrostu β; TNF α i β — czynniki martwicy nowotworu α i β; tPA — aktywator plazminogenu typu tkankowego; uPA — aktywator plazminogenu

typu urokinazowego; uPAR — receptor aktywatora plazminogenu typu urokinazowego; VEGF — naczyniowy czynnik wzrostu komórek śródbłonna.

### I. Wprowadzenie

Progresja nowotworów jest złożonym procesem, w którym komórki rakowe migrują z ogniska pierwotnego do węzłów chłonnych oraz naczyń krwionośnych i z krwią docierają do odległych narządów tworząc ogniska wtórne — przerzuty. Komórki nowotworowe i przylegające do guza komórki stromy uwalniają enzymy proteolityczne trawiące składniki macierzy zewnątrzkomórkowej (ECM) [1]. Wyróżniamy cztery klasy enzymów proteolitycznych: 1) metaloproteazy macierzowe (MMP): kolagenazy,

<sup>1</sup>Mgr, <sup>2</sup>dr hab. Katedra Genetyki Molekularnej Uniwersytetu Łódzkiego, ul. Banacha 12/16, 90-237 Łódź

żelatynazy, stromielizyny; 2) proteazy cysteinowe: katepsyny B i L; 3) proteazy aspartylowe katepsyny D oraz 4) proteazy serynowe, w tym składniki urokinazowego układu aktywacji plazminogenu [2]. Proteazy degradują macierz zewnątrzkomórkową i błonę podstawną, umożliwiając inwazję komórek nowotworowych. Metaloproteazy macierzowe wykazują aktywność endopeptydaz zależnych od jonów  $Zn^{2+}$  i  $Ca^{2+}$ . Wiele procesów fizjologicznych, takich jak embriogeneza, angiogeneza, rozwój kości i szkliwa zębów, cykl reprodukcyjny oraz gojenie ran jest uwarunkowane przekształcaniem macierzy zewnątrzkomórkowej prowadzonej przy udziale metaloproteaz [3]. Oprócz udziału w procesach fizjologicznych, metaloproteazy mogą również odgrywać ważną rolę w progresji nowotworów — ich podwyższony poziom u chorych towarzyszy na ogół złemu rokowaniu [4].

## II. Struktura metaloproteaz macierzowych

Metaloproteazy macierzowe są to zewnątrzkomórkowe lub błonowe enzymy trawiące składniki macierzy zewnątrzkomórkowej. Na podstawie budowy i swoistości substratowej zostały one podzielone na kolagenazy, stromielizyny, żelatynazy oraz metaloproteazy transbłonowe (Tabela 1) [5]. Metaloproteazy macierzowe charakteryzują się strukturą domenową (Ryc. 1). Wszystkie metaloproteazy, oprócz metaloproteazy transbłonowej-1, zawierają *N*-końcową predomenę z sygnałową sekwencją aminokwasów hydrofobowych, warunkującą uwalnianie metaloproteaz do środowiska zewnątrzkomórkowego. Domena katalityczna metaloproteaz zawiera miejsce wiązania dwuwartościowego jonu cynku utworzone przez dwie reszty cysteiny. Metaloproteazy są wydzielane z komórek w formie zymogenów zawierających w *N*-końcu prodomenę z konserwatywną sekwencją PRCGVDP mogącą oddziaływać z domeną katalityczną blokując aktywność proteolityczną [6]. Wszystkie metaloproteazy, oprócz matrylizyny, zawierają domenę podobną do hemopeksyny, oddzieloną od domeny katalitycznej fragmentem *hinge* o zróżnicowanej strukturze i długości. Różnice strukturalne tego fragmentu determinują różnice w swoistości enzymatycznej między grupą stromielizyn i kolagenaz [7]. Żelatynazy A i B zawierają fragment fibronektynopodobny biorący udział w wiązaniu elastyny [8]. W *C*-końcu domeny katalitycznej żelatynazy B znajduje się fragment kolagenopodobny. Metaloproteazy błonowe mają w *C*-końcu krótką domenę transbłonową warunkującą ich zakotwiczenie w błonie komórkowej oraz domenę fury-

nopodobną, występującą również w stromielizynie-3. Domena ta jest trawiona przez furynoproteazę podczas początkowego etapu aktywacji metaloproteaz transbłonowych oraz stromielizyny-3 [9]. Domena transbłonowa występuje również w ostatnio zidentyfikowanych metaloproteazach: MMP-21 i MMP-22, które mają charakterystyczne regiony bogate w prolinę oraz domenę podobną do receptora interleukiny-1 [10].

## III. Geny metaloproteaz macierzowych

Geny metaloproteaz macierzowych występują w różnych chromosomach (Tabela 1), ale charakteryzują się homologią sekwencyjną obszarów kodujących domeny pre-, pro- i katalityczną, co sugeruje, że geny te mogły powstać przez duplikację [11]. Różnorodność domen metaloproteaz wskazuje na możliwość „tawowania eksonów” (ang. *shuffling exon*) w ewolucji ich genów [12]. W obszarze chromosomowym 11q21-23 znajdują się geny kilku metaloproteaz, charakteryzujące się wysoką homologią sekwencji kodujących [13]. Organizację obszarów promotorowych genów metaloproteaz macierzowych przedstawiono na rycinie 2. W regionie promotorowym genów wielu metaloproteaz występują: sekwencja TGAg/cTCA, wiążąca czynniki transkrypcyjne AP-1 (ang. *Activating Protein-1*), AP-2 oraz miejsce PEA3 (ang. *Polyoma Enhancer Activator*) o sekwencji A/CGGAA/T wiążące czynnik transkrypcyjny Ets [14, 15]. Przyłączenie czynnika AP-1 do sekwencji TGAg/cTCA, znajdującej się pomiędzy -66 i -72 w obszarze promotorowym genów metaloproteaz, indukuje ekspresję bez udziału czynników zewnętrznych. Niektóre geny metaloproteaz zawierają kilka miejsc wiązania AP-1 — możliwe, że są to sekwencje wzmacniające ich ekspresję [16]. Gen żelatynazy A nie zawiera odcinka wiążącego AP-1; brak w nim także kasety TATA. Promotor genu metaloproteazy transbłonowej-1 jest również pozbawiony kasety TATA, zawiera natomiast sekwencję bogatą w nukleotydy GC z miejscami wiązania czynników Sp1 i Egr-1, które indukują ekspresję *MT1* [17]. Gen *MMP-3* w obszarze promotorowym ma charakterystyczną sekwencję odpowiedzialną za indukcję ekspresji przez czynnik wzrostu płytek krwi (PDGF). Geny *MMP-7* i *MMP-13* zawierają w promotorze sekwencje biorące udział w hamowaniu ekspresji przez transformujący czynnik wzrostu  $\beta$  (TGF  $\beta$ ) [18]. W regionie promotorowym genu *MMP-1* występuje polimorfizm deleccyjno-insercyjny 1G/2G w pozycji -1607:

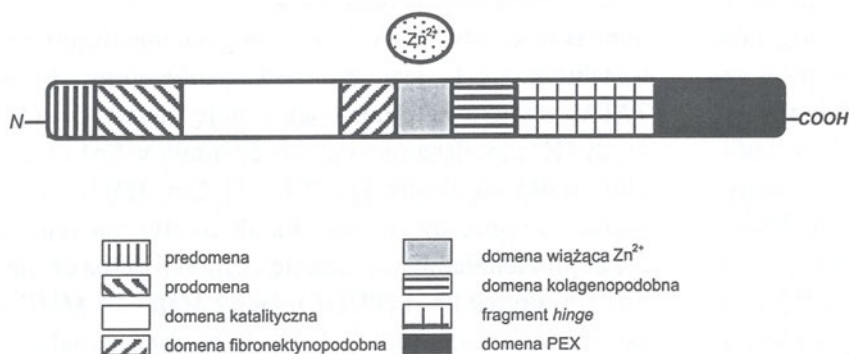
wariant deleccyjny 1G	-1611-GAAAGATATGA-
wariant insercyjny 2G	-1611-GAAAGGATATGA-



## Tabela 1

Metaloproteazy macierzowe – ich geny i substraty

Metaloproteaza	Oznaczenie skrótowe	Locus genu	Substrat
<b>KOLAGENAZY</b>			
kolagenaza-1 śródmiażdżowa	MMP-1	11q22-23	Kolagen typu: I, II, III, VII, VIII, X, agrekan, tenascyna
kolagenaza-2 neutrofilii	MMP-8	11q21-22	Kolagen typu: I, II, III, VII, X, agrekan
kolagenaza-3	MMP-13	11q22.3	Kolagen typu: I, II, III, VII, X, żelatyna, agrekan
kolagenaza-4	MMP-18		Kolagen typu I
<b>STROMIELIZYNY</b>			
stromielizyna-1	MMP-3	11q23	Proteoglikany, kolagen typu: I, III, IV, VIII, X, XII, fibronektyna, agrekan, laminina, elastyna
stromielizyna-2	MMP-10	11q22.3-23	Proteoglikany, kolagen typu: I, III, IV, IX, XI, XII, fibronektyna, agrekan, laminina, elastyna, tenascyna, witronektyna, tenascyna
stromielizyna-3	MMP-11	22	Proteoglikany, kolagen typu IV, fibronektyna, agrekan, laminina, elastyna, entaktyna, tenascyna
matrylizyna	MMP-7	11q21-22	Proteoglikany, kolagen typu IV, fibronektyna, laminina, elastyna, entaktyna
metaloelastaza	MMP-12	11q22.2	
<b>ŻELATYNAZY</b>			
żelatynaza A	MMP-2	16q13	Kolagen typu: I, II, IV, VII, X, XI, fibronektyna, agrekan, laminina, elastyna, witronektyna, MMP-18
żelatynaza B	MMP-9	20q11.2-q13.1	Kolagen typu: II, IV, V, VII, X, XI, fibronektyna, agrekan, laminina, elastyna, witronektyna, MMP-18
<b>METALOPROTEAZY BŁONOWE</b>			
MT1-MMP	MMP-14	14q11-q12	Kolagen typu I, II, III, fibronektyna, agrekan, laminina, tenascyna, witronektyna, nidogen
MT2-MMP	MMP-15	16q13-q21	Proteoglikany, kolagen typu I, III, fibronektyna, agrekan, laminina, elastyna, tenascyna, nidogen
MT3-MMP	MMP-16	8q21	Kolageny
MT4-MMP	MMP-17	12q24	Kolageny
<b>POZOSTAŁE</b>			
MMP-19	MMP-19	12q14	Amelogenina, enamelina
enamelizyna	MMP-20	11q22	

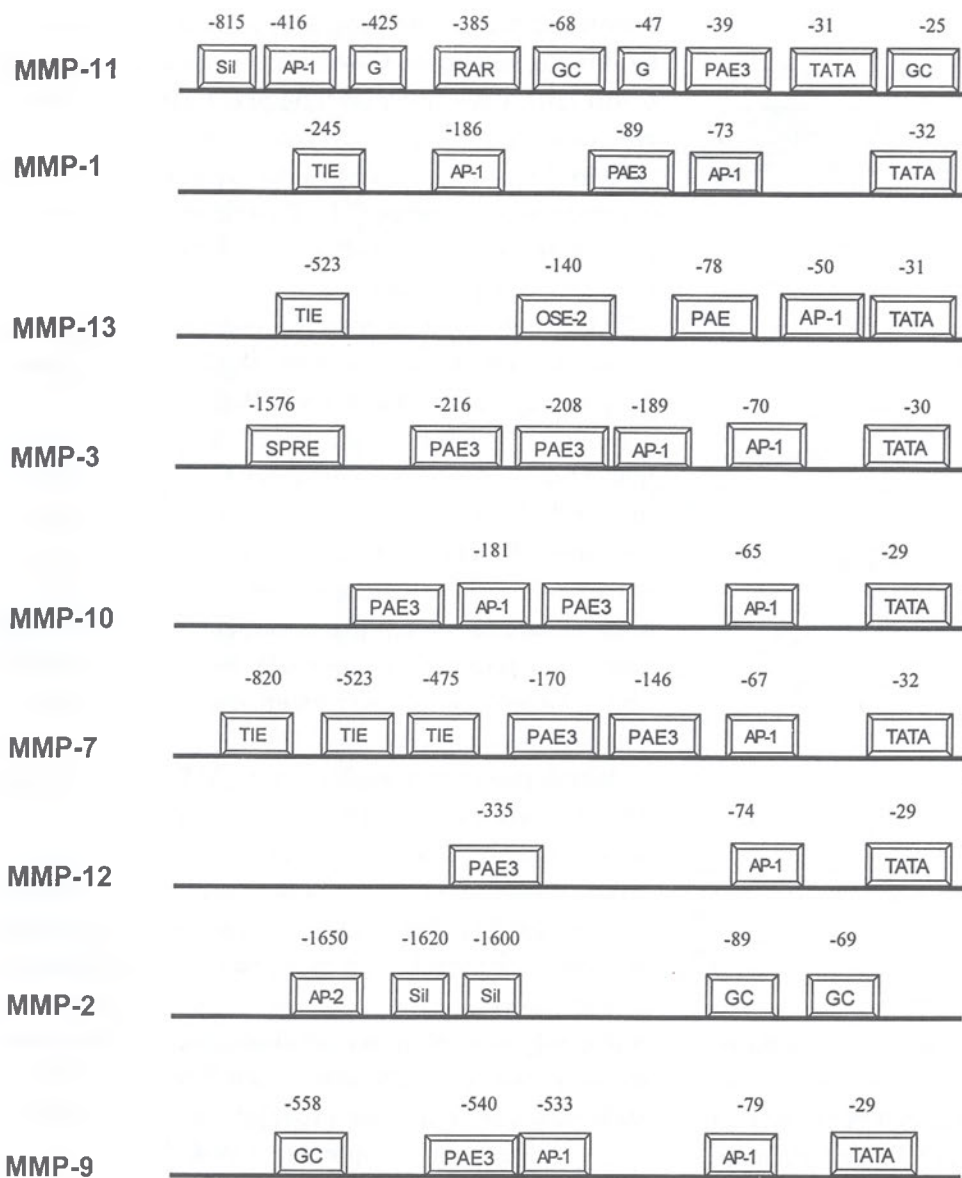


Ryc. 1. Schemat struktury żelatynazy B (MMP-9)

W przypadku wariantu 2G insercja guaniny w pozycji -1607 powoduje powstanie sekwencji 5'-GGA-3' wiążącej czynnik Ets; sekwencja ta graniczy z sekwencją wiążącą AP-1. Ets, aktywując transkrypcję razem z AP-1, powoduje podwyższenie poziomu ekspresji *MMP-1* [19].

## IV. Regulacja aktywności enzymatycznej metaloproteaz macierzowych

Aktywność metaloproteaz macierzowych zależy od poziomu ekspresji ich genów oraz od przemian proteolitycznych ich zymogenów i obecności fizjo-



Ryc. 2. Organizacja obszarów promotorowych genów metaloproteaz. AP-1 — sekwencja wiążąca czynnik transkrypcyjny AP-1, PEA3 — sekwencja wiążąca czynnik transkrypcyjny Ets, TIE — sekwencja wyciszająca w odpowiedzi na działanie TGF $\beta$ , GC — sekwencja wiążąca czynnik transkrypcyjny Sp-1, OSE-2 sekwencja specyficzna dla osteoblastów, SPRE — element odpowiedzi na działanie PDGF, RARE — element odpowiedzi na działanie kwasu retinowego

logicznych inhibitorów tkankowych (TIMP) w środowisku zewnątrzkomórkowym [20].

#### IV-1. Regulacja ekspresji genów metaloproteaz macierzowych

W aktywacji ekspresji genów metaloproteaz macierzowych biorą udział czynniki transkrypcyjne AP-1, AP-2, Ets, Sp-1, Egr1. Najważniejszą rolę zdaje się spełniać czynnik AP-1, który może występować w formie heterodimeru składającego się z produktów onkogenów *jun* i *fos* oraz w formie homodimeru produktów onkogeny *jun* [21]. AP-1 jest konieczny dla ekspresji metaloproteaz podstawowej i indukowanej przez czynniki angiogenne: FGF, VEGF, TNF $\alpha$ , EGF, interleukinę-1 $\alpha$ , TGF $\alpha$  [22, 23]. Czynniki wpływające na poziom ekspresji genów metaloproteaz zostały zamieszczone w tabeli 2. Gen żelatynazy A nie reaguje na czynnik wzrostu, gdyż w jego obszarze promotorowym nie występuje sekwen-

cja wiążąca czynnik AP-1. Wzrost aktywności metaloproteaz może być osiągany przez wzrost poziomu transkrypcji ich genów. Czynniki Ets działa jako koaktywator transkrypcji *MMP-1* — jego przyłączenie do sekwencji promotorowej PEA3 powoduje wzrost ekspresji indukowanej przez czynnik AP-1 [24]. Również składniki ECM mogą oddziaływać z genami metaloproteaz — w komórkach hodowanych na podłożu z kolagenem typu I poziom ekspresji genów *MT1-MMP* i *MMP-2* był wyższy niż w komórkach hodowanych na podłożach zawierających lamininę, fibronektynę i kolagen typu IV [25]. Składniki macierzy zewnątrzkomórkowej mogą także wywierać wpływ na ekspresję genów metaloproteaz za pośrednictwem integryn — w fibroblastach wiązanie receptora integrynowego  $\alpha_5\beta_1$  z sekwencją RGD w fibronektynie indukowało wzrost poziomu ekspresji genu *MMP-1*, natomiast specyficzne wiązanie integryny  $\alpha_4\beta_1$  z fibronektyną powodowało spadek poziomu jego ekspresji [26].

**Tabela 2**

Czynniki biorące udział w regulacji ekspresji genów metaloproteaz

Czynniki transkrypcyjne aktywujące ekspresję genów MMP
AP-1
AP-2
Ets
Sp-1
Egr1
Czynniki indukujące ekspresję genów MMP
FGF
VEGF
TNF
EGF
interleukina-1 $\alpha$
TGF $\alpha$
kolagen typu I
integryna $\alpha_5\beta_1$
estrogeny
Czynniki hamujące ekspresję genów MMP
hormony tarczycy
progesteron
androgeny
glukokortykoidy
kwas retinowy
integryny $\alpha_4\beta_1$

Hamowanie ekspresji genów metaloproteaz może zachodzić przez wiązanie czynnika AP-1 przez inne białka i blokowanie w ten sposób jego zdolności do aktywacji transkrypcji genów MMP. Tak działają hormony tarczycy, progesteron i androgeny w kompleksach ze swoimi receptorami jądrowymi oraz glukokortykoidy i kwas retinowy, który ponadto hamuje ekspresję genów *jun* i *fos*, kodujących składniki AP-1 [27, 28].

#### IV-2. Aktywacja zymogenów metaloproteaz macierzowych

Proteolityczna aktywacja zymogenów metaloproteaz zachodzi dwuetapowo. W pierwszym etapie następuje trawienie prodomeny między dwoma  $\alpha$ -helisami, prowadzące do osłabienia oddziaływania pomiędzy prodomeną i domeną katalityczną. To prawdopodobnie umożliwia autokatalityczne odcięcie fragmentu prodomeny z peptydem PRCGVPD, co prowadzi do powstania enzymów o pełnej aktywności katalitycznej [29]. Metaloproteazy mogą być ak-

tywowane przez inne proteazy: plazminę, trypsynę, kalikreinę, katepsynę G i elastazę pochodzącą z neutrofilii [30]. Plazmina powstaje przez aktywację plazminogenu przy udziale aktywatorów plazminogenu typu urokinazowego (uPA) i tkankowego (tPA), receptora urokinazowego (uPAR) oraz inhibitorów aktywatorów typu 1 (PAI-1) i 2 (PAI-2)<sup>1</sup>. Aktywność uPA oraz tPA jest regulowana przez inhibitory PAI-1 i PAI-2, natomiast aktywność samej plazminy jest hamowana przez  $\alpha_2$ -antyplazminę [2, 31]. Plazmina bezpośrednio aktywuje pro-MMP-1, -3, -10 i -13, co prowadzi do kaskady aktywacji kolejnych metaloproteaz. MMP-3 przekształca zymogeny: proMMP-7, -8, -9, -13 i -1 [32]. MMP-7 aktywuje pro-MMP-1, natomiast MMP-10 przekształca zymogen proMMP-8 [33, 34]. Zależności między składnikami układu aktywacji plazminogenu i metaloproteazami macierzowymi wskazują na współdziałanie obu systemów w przekształceniach macierzy zewnątrzkomórkowej (Ryc. 3) [35].

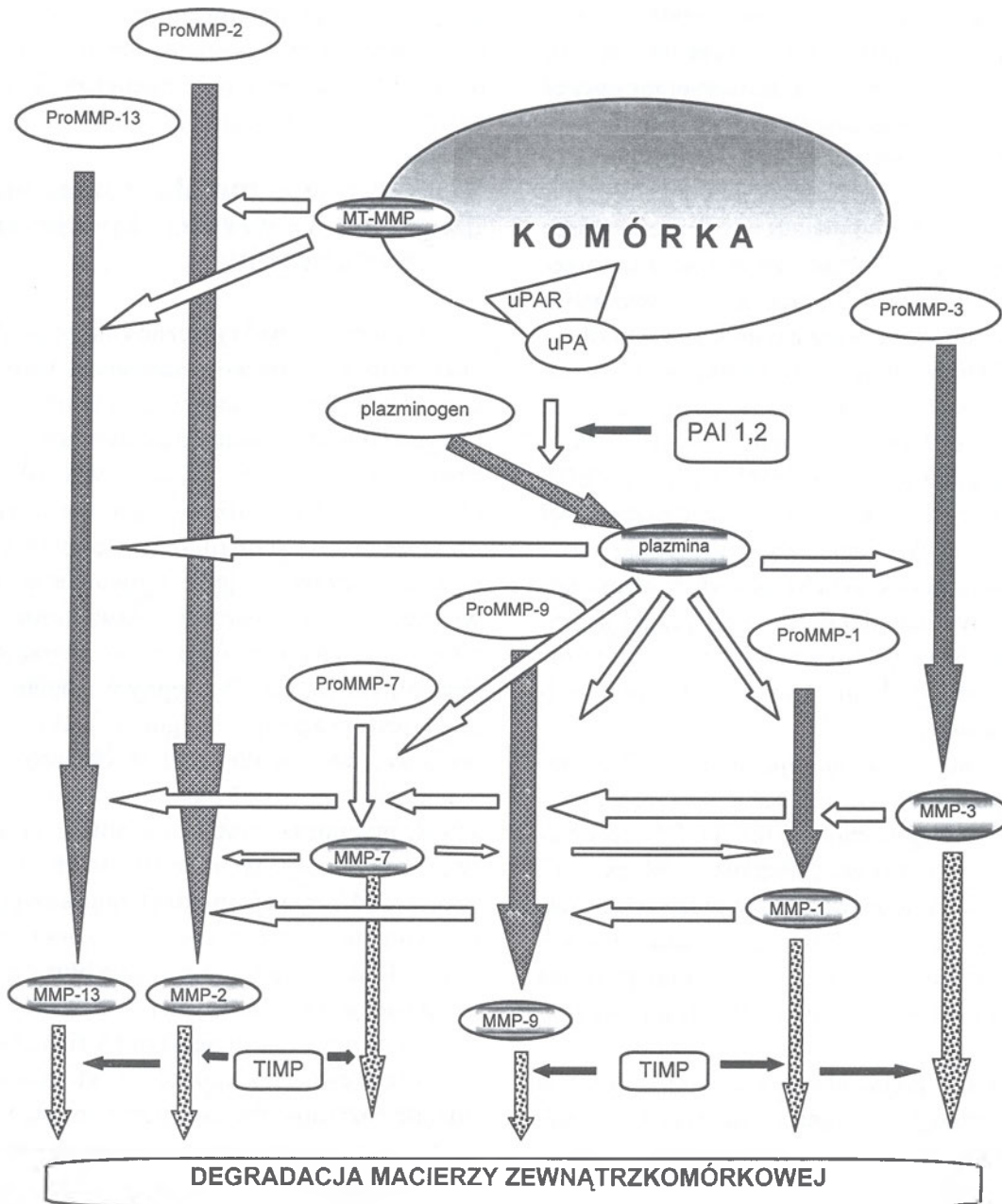
Metaloproteazy transbłonowe (MT-MMP) biorą udział w aktywacji żelatynazy A oraz kolagenazy 3, a same mogą być aktywowane już w aparacie Golgiego i na powierzchni komórki występują w formie aktywnej [36, 37]. Także na powierzchni komórki ma miejsce aktywacja zymogenu metaloproteazy transbłonowej-1 przez plazminę [38]. Prożelatynaza A jest aktywowana przez autokatalityczne trawienie wiązania peptydowego Asn<sup>37</sup>-Leu<sup>38</sup> w prodomenie, zachodzące przy udziale prożelatynazy A i tkankowego inhibitora metaloproteaz. [39-41].

#### IV-3. Tkankowe inhibitory metaloproteaz macierzowych

Aktywność metaloproteaz macierzowych w środowisku zewnątrzkomórkowym może być hamowana jest przez inhibitory tkankowe (TIMP): TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 i TIMP-4 [34, 42]. Geny kodujące TIMP znajdują się w różnych chromosomach, a ich ekspresja podlega indywidualnej regulacji [43, 44]. Tkankowe inhibitory metaloproteaz są białkami zewnątrzkomórkowymi, o małej masie cząsteczkowej, charakteryzującymi się wysoką homologią sekwencji aminokwasowej. Wszystkie tkankowe inhibitory metaloproteaz zawierają 12 reszt cysteiny, które tworzą 6 mostków disulfidowych zapewniających stabilną konformację cząsteczki [45, 46]. Tkankowe inhibitory metaloproteaz mogą tworzyć

<sup>1</sup>Problem aktywacji plazminogenu był poruszany w *Postęпах Biochemii* 36(3-4)1991, 45(1)1999, 46(3)2000





Ryc. 3. Schemat regulacji aktywności MMP przy udziale składników układu aktywacji plazminogenu. Symbolem  $\Rightarrow$  zaznaczono przejście zymogenu metaloproteaz macierzowych do formy aktywnej, symbolem  $\rightleftarrows$  zaznaczono proteolityczną aktywację poszczególnych metaloproteaz, symbolem  $\leftarrow$  zaznaczono hamowanie aktywności proteolitycznej, symbolem  $\dashrightarrow$  zaznaczono proteolityczną degradację macierzy zewnątrzkomórkowej

niekowalencyjne kompleksy stechiometryczne z aktywnymi metaloproteazami [45]. Domena N-końcowa tkankowych inhibitorów może wiązać się z domeną katalityczną metaloproteaz, hamując jej aktywność proteolityczną, natomiast domena C-końcowa może reagować z żelatynazami A i B [45, 47].

Tkankowe inhibitory metaloproteaz wykazują zróżnicowaną skuteczność: TIMP-2 hamuje aktywność żelatynazy A siedem razy efektywniej niż TIMP-1, natomiast TIMP-1 dwa razy skuteczniej hamuje aktywność kolagenazy śródmiąższowej [48]. Inhibitory różnią się też swoistością: TIMP-2 preferencyjnie wiąże prożelatynazę B, a TIMP-1 tworzy kompleks tylko z prożelatynazą A [49]. Równowaga

między aktywnymi formami metaloproteaz i ich niezwiązanymi inhibitorami określa zakres zmian w strukturze macierzy zewnątrzkomórkowej. Zaburzenia tej równowagi towarzyszą wielu stanom patologicznym, takim jak nowotworzenie, arterioskleroza, reumatyzm, choroba Alzheimera [50].

## V. Rola metaloproteaz macierzowych w procesach fizjologicznych

Wiele procesów fizjologicznych, takich jak angiogeneza, embriogeneza, rozwój kości i szkliwa zębów, cykl reprodukcyjny oraz gojenie ran, uwarunkowanych jest przekształceniami macierzy

zewnątrzkomórkowej przy udziale metaloproteaz. Angiogeneza<sup>2</sup> jest procesem tworzenia naczyń krwionośnych zachodzącym w trakcie embriogenezy, kiedy formowane są pierwotne naczynia krwionośne, a także w rozwoju osobniczym podczas cyklicznych zmian w endometrium i jajnikach, w łożysku i gruczołach mlekowych w czasie ciąży oraz w procesie gojenia ran. Przed rozpoczęciem angiogenezy komórki śródbłonna biorące udział w tworzeniu naczyń są stymulowane przez czynnik wzrostu fibroblastów (FGF) oraz naczyniowy czynnik wzrostu komórek śródbłonna (VEGF), które indukują także ekspresję genów metaloproteaz macierzowych [51, 52]. FGF indukuje ekspresję genu *MMP-3* [52], a VEGF — genów żelatynaz i kolagenazy śródmiąższowej [53]. W wyniku skoordynowanego działania metaloproteaz oraz białek układu aktywacji plazminogenu i plazminy dochodzi do proteolitycznej degradacji błony podstawnej i macierzy zewnątrzkomórkowej, co umożliwia komórkom śródbłonna migrację i formowanie naczyń.

Proces gojenia ran obejmuje migrację fibroblastów i keratynocytów do miejsca uszkodzenia oraz unaczynienie nowopowstającej tkanki. Obydwa etapy zawierają proteolityczną degradację błony podstawnej oraz zrębu tkankowego, w której kluczową rolę odgrywają metaloproteazy: żelatynaza A i B, kolagenaza 3, stromielizyna 1 i 3, metaloproteaza transbłonowa oraz metaloelastaza makroflagowa [54, 55].

W komórkach zrębu błony śluzowej macicy w czasie menstruacji występuje kolagenaza śródmiąższowa, stromielizyna-1 i żelatynaza B, co sugeruje ich udział w złuszczeniu i krwawieniu błony śluzowej macicy [56]. W fazie proliferacyjnej endometrium następuje ekspresja stromielizyn -1 i -3 oraz matrylizyny i prawdopodobnie te metaloproteazy biorą udział w tworzeniu naczyń krwionośnych błony śluzowej macicy [57, 58]. Z kolei w trofoblastach stwierdzono ekspresję żelatynaz A i B, które po zapłodnieniu umożliwiają wszczęcie zarodka do ściany macicy [59].

Embriogenezie oraz rozwojowi osobniczemu towarzyszy szereg zmian w macierzy zewnątrzkomórkowej zachodzących z udziałem metaloproteaz, odgrywających znaczącą rolę w rozwoju i formowaniu kości, chrząstek oraz szkliwa zębów [60]. W osteoklastach stwierdzono ekspresję żelatynaz A i B, kolagenazy 3 oraz stromielizyny 3, które trawią kola-

gen, główny składnik osteoidu [61, 62]. Metaloproteazą macierzową biorącą udział w dojrzewaniu białek szkliwa zęba jest enamelizyna, która trawi enamelinę i amelogeninę [63, 64].

## VI. Znaczenie metaloproteaz macierzowych we wzroście i progresji nowotworów

Angiogeneza ma krytyczne znaczenie dla wzrostu guza nowotworowego, natomiast jego progresja uwarunkowana jest ruchliwością komórek nowotworowych i ich zdolnością do przekształcania macierzy zewnątrzkomórkowej. Wraz ze wzrostem guza pobieranie substancji odżywczych i wydalanie katabolitów na drodze dyfuzji staje się niewystarczające, dlatego niezbędne jest wytworzenie przez guz własnej sieci naczyń krwionośnych umożliwiających jego szybki wzrost o charakterze eksponencjalnym [2, 65]. Następnym etapem w rozwoju guza jest progresja — guz nacieka tkankę prawidłową, dociera do węzłów chłonnych i naczyń krwionośnych, skąd komórki nowotworowe, z krwią, przemieszczane są do odległych narządów i tworzą przerzuty. W progresji niezbędne jest naruszenie oddziaływań międzykomórkowych w guzie pierwotnym oraz nabycie przez komórki nowotworowe zdolności do przekraczania błony podstawnej i ścian naczyń krwionośnych [1]. Zarówno angiogeneza jak i progresja wymagają modyfikacji składników macierzy zewnątrzkomórkowej, która zachodzi przy udziale enzymów proteolitycznych, głównie metaloproteaz macierzowych, uwalnianych przez komórki nowotworowe oraz przylegające do nich komórki stromy [2]. Metaloproteazy mogą mieć również wpływ na proliferację i apoptozę, a więc mogą modulować wzrost guza nowotworowego już we wczesnych etapach jego rozwoju.

### VI-1. Znaczenie diagnostyczne i prognostyczne w nowotworach złośliwych

Wzrostowi poziomu ekspresji genów MMP towarzyszy zazwyczaj wzrost stopnia złośliwości nowotworu oraz skrócony okres przeżycia pacjentów. Największe znaczenie w progresji nowotworów mogą mieć żelatynazy A i B, matrylizyna, stromielizyna 3 i kolagenaza śródmiąższowa (MMP-1), gdyż trawią one kolagen typu IV będący głównym składnikiem

<sup>2</sup>Problem angiogenezy był poruszany w *Postęпах Biochemii* 46(3)2000

blony podstawnej. Degradacja błony podstawnej umożliwia komórkom nowotworowym penetrację tkanki prawidłowej oraz przekraczanie ścian naczyń krwionośnych. Kilka genów MMP znajduje się w 11q21-23, a amplifikację tego obszaru obserwuje się w wielu złośliwych guzach litych [13]. Metaloproteazy macierzowe biorące udział w rozwoju i progresji nowotworów wymienione są w tabeli 3.

**Tabela 3**

Znaczenie metaloproteaz macierzowych jako czynników prognostycznych w nowotworach złośliwych

Nowotwór	MMP	Znaczenie prognostyczne
Rak przełyku	MMP-2, MMP-3 MMP-1	Przerzuty do węzłów chłonnych Krótki okres przeżycia pacjenta
Rak żołądka	MT MMP-1, MT MMP-2 MMP-2, MMP-9 MMP-7	Zaawansowanie rozwoju sieci naczyń guza Krótki okres przeżycia pacjenta Przerzuty do węzłów chłonnych i wątroby
Rak jelita grubego	MMP-9 MMP-1	Przerzuty odległe, krótki okres bez wznowy choroby, krótki okres przeżycia pacjenta Wzrost stopnia złośliwości nowotworu, krótki okres przeżycia pacjenta
Rak trzustki	MMP-2	Wzrost stopnia złośliwości nowotworu
Rak sutka	MMP-11 MMP-2, MMP-9	Wzrost stopnia złośliwości nowotworu, krótki okres bez wznowy choroby Przerzuty do węzłów chłonnych, krótki okres przeżycia pacjenta
Rak prostaty	MMP-2	Inwazyjny fenotyp guza, przerzuty do węzłów chłonnych
Rak jajnika	MMP-2	Inwazyjny fenotyp guza, przerzuty do węzłów chłonnych
Rak płuc	MMP-2	Inwazyjny fenotyp guza, przerzuty do węzłów chłonnych

nowotworach piersi stwierdzono wysoki poziom stromielizyny-3, która nie występuje w prawidłowym nabłonku gruczołowym sutka. W fibroblastach przylegających do komórek rakowych sutka obserwowano ekspresję stromielizyny-3, indukowaną przez komórki nowotworowe. Wysoki poziom tej metaloproteazy związany jest ze wzrostem stopnia złośliwości nowotworów sutka oraz z krótszym

W nowotworach przełyku wysoki poziom żelatynazy A i stromielizyny-1 związany jest z występowaniem przerzutów do węzłów chłonnych, natomiast obecność kolagenazy śródmiąższowej towarzyszy krótszemu okresowi przeżycia [66, 67]. W rakach żołądka wykazano związek między wysokim poziomem metaloproteazy transbłonowej-1 i żelatynazy A a stopniem rozwoju sieci naczyń krwionośnych guza; oprócz tego zwiększonemu poziomowi żelatynazy A i B towarzyszył krótszy okres przeżycia pacjentów [68]. Wysoki poziom matrylizyny może występować razem z przerzutami z guza żołądka do węzłów chłonnych i wątroby [69, 70]. W nowotworach jelita grubego stwierdzono dodatnią korelację między zwiększonym poziomem mRNA żelatynazy B a wystąpieniem przerzutów odległych, krótszym okresem bez wznowy choroby oraz krótszym okresem przeżycia [71]. Obecność kolagenazy śródmiąższowej w tych nowotworach związana jest z kolei ze wzrostem stopnia złośliwości nowotworu i krótszym okresem przeżycia [72]. Inwazyjnemu charakterowi nowotworów trzustki towarzyszyć może zwiększony poziom ekspresji żelatynazy A [73]. W

okresem bez wznowy [74, 75]. Poziom żelatynaz A i B w tych nowotworach jest dodatnio skorelowany z wystąpieniem przerzutów do węzłów chłonnych oraz krótkim okresem przeżycia [76, 77]. W nowotworach prostaty, jajnika i płuc zwiększony poziom żelatynazy A towarzyszył inwazyjnemu fenotypowi guza oraz przerzutom w węzłach chłonnych [78–80].

## VI-2. Wzrost guzów nowotworowych

Wyniki badań nad wczesnymi etapami nowotworzenia wskazują na znaczny wpływ metaloproteaz na powstawanie oraz wzrost guzów nowotworowych. Transfekowanie komórek nowotworowych zdolnych do metastazy genami tkankowych inhibitorów metaloproteaz TIMP-1 i -2 powodowało zmniejszenie liczby przerzutów oraz zahamowanie wzrostu guzów [81]. Wśród zmodyfikowanych genetycznie myszy Min predysponowanych do nowotworów jelita, wyłączenie genu matrylizyny powodowała spadek o 58% liczby guzów w porównaniu z grupą kontrolną zawierającą aktywny gen. Podobne efekty uzyskano stosując u myszy Min batimastat — syntetyczny in-



hibitor metaloproteaz [82, 83]. Prawdopodobny mechanizm działania metaloproteaz we wczesnych etapach nowotworzenia związany jest z przekształcaniem przez nie czynników wzrostu, ich receptorów oraz składników macierzy zewnątrzkomórkowej odpowiedzialnych za oddziaływania komórka — komórka i komórka — macierz. Metaloproteazy aktywują wiele czynników wzrostu i ich receptory, w tym receptor FGF typu 1, ligandy receptora EGF, TGF- $\alpha$ , HB-EGF [84-87]. Metaloproteazy przekształcają również integryny, co może prowadzić do przekazywania sygnałów do apoptozy między komórkami [88, 89]. Stromielizyna-1 trawi E-kadhedrynę, która jest integryną odgrywa zasadniczą rolę w oddziaływaniach międzykomórkowych [90]. Trawienie E-kadhedryny prowadzi do utraty inhibicji kontaktowej, która jest jednym z mechanizmów ograniczającym podziały komórkowe w tkankach prawidłowych [91].

### VI-3. Angiogeneza w nowotworach złośliwych

Komórki nowotworowe uwalniają wiele czynników regulujących proces angiogenezy, w tym VEGF i FGF, które aktywują komórki śródbłonka oraz indukują ekspresję genów MMP i składników układu aktywacji plazminogenu [52, 53]. Po miejscowym strawieniu błony podstawnej komórki śródbłonka migrują i dopasowują swe wzajemne położenia, tworząc strukturę kielka, która rozwija się i przekształca w kapilarne naczynie krwionośne. Zahamowanie proteolizy i dojrzewanie nowego naczynia następuje w wyniku współdziałania integryny  $\alpha_v\beta_3$  i domeny PEX przypominającej hemopeksynę i obejmującej C-końcowy fragment żelatynazy-A. W nowotworach złośliwych forma PEX może występować w kompleksie z integryną  $\alpha_v\beta_3$ . W czasie rozwoju nowotworu PEX oddziałuje z integrynami  $\alpha_v\beta_3$  znajdującymi się na powierzchni komórek śródbłonka, regulując formowanie naczyń wrażliwego guza [92]. Znaczenie metaloproteaz w powstawaniu sieci naczyń krwionośnych guza potwierdzają wyniki badań, w których tkankowe inhibitory metaloproteaz macierzowych powodowały hamowanie degradacji ECM oraz blokowały migrację komórek śródbłonka [93]. W nowotworach myszy, u których indukowano angiogenezę, brak żelatynazy A spowodował spadek tempa wzrostu guza [94].

### VI-4. Inwazja i metastaza

Zdolność nowotworu do inwazji i metastazy związana jest ze zwiększoną ruchliwością komórek

nowotworowych. Przemieszczanie się komórek uwarunkowane jest występowaniem na ich powierzchni wypustek cytoplazmatycznych takich jak pseudopodia, lamelipodia oraz inwadopodia, które oddziałują ze składnikami macierzy zewnątrzkomórkowej [95]. W inwadopodiach w miejscu degradacji macierzy stwierdzono występowanie żelatynazy A oraz transbłonowej metaloproteazy-1, natomiast w lamelipodiach, oprócz żelatynazy A i transbłonowej metaloproteazy-1, wykazano również obecność TIMP-2 [96]. Żelatynaza A, aktywowana przez metaloproteazę transbłonową-1 przy udziale TIMP-2, może przyłączać się do receptora integrynowego  $\alpha_v\beta_3$  znajdującego się na powierzchni komórek nowotworowych. Prożelatynaza A (72 kDa) tworzy kompleks z TIMP-2 oraz metaloproteazą transbłonową-1 (MT-1 MMP), w którym jest przekształcana przez MT-1 MMP do fragmentu o masie 64 kDa. Fragment ten, po odłączeniu od MT-1 MMP, wiąże się swoją domeną C-końcową PEX z integryną  $\alpha_v\beta_3$ , co prowadzi do autokatalitycznej aktywacji żelatynazy A. Aktywna żelatynaza przyłączona do receptora integrynowego  $\alpha_v\beta_3$  trawi kolagen, w wyniku czego dochodzi do degradacji ECM umożliwiającej inwazję nowotworu [97]. Przy braku TIMP-2 prożelatynaza A zostaje przekształcona do fragmentu o masie 62 kDa, od którego zostaje odłączona domena PEX mogąca wiązać się z integryną  $\alpha_v\beta_3$ , blokując proteolityczną aktywność żelatynazy A na powierzchni komórki [92, 98]. W ruchliwości komórek oraz ich adhezji do ECM uczestniczą również powierzchniowe białka tetraspaniny. Białkowy kompleks integryna  $\alpha_v\beta_3$ /tetraspanina, biorący udział w migracji komórek nowotworowych *in vitro*, może stymulować wytwarzanie żelatynazy A [99]. W komórkach raka jelita grubego charakteryzujących się wysokim poziomem receptora integrynowego  $\alpha_v\beta_6$ , stwierdzono wzrost poziomu żelatynazy B, co mogło powodować skupienie aktywności proteolitycznej na powierzchni komórek [100]. W komórkach czerniaka powierzchniowy receptor CD44 łączy się z aktywną formą żelatynazy B, a rozdzielenie tego kompleksu prowadzi do zmniejszenia stopnia inwazyjności komórek nowotworowych *in vivo* [101].

## VII. Hamowanie aktywności metaloproteaz macierzowych w terapii przeciwnowotworowej

Ze względu na znaczenie metaloproteaz we wzroście i progresji nowotworów, prowadzone są prace

nad syntetycznymi inhibitorami oraz terapią genową skierowaną na geny metaloproteaz i ich inhibitorów.

### VII-1. Syntetyczne inhibitory metaloproteaz macierzowych

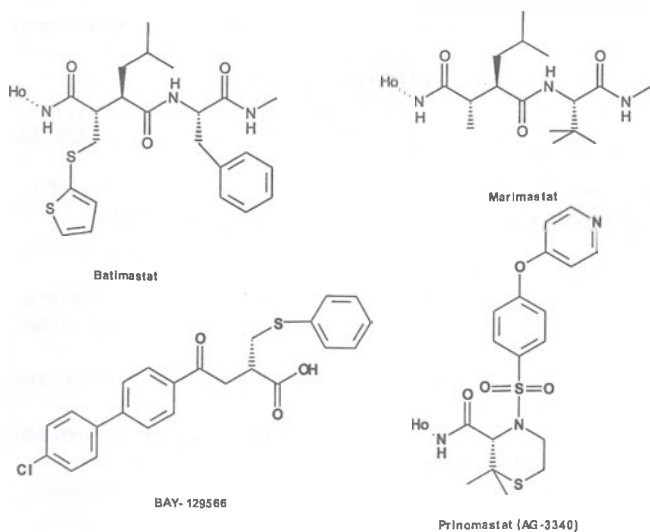
Obecnie stosuje się blokowanie aktywności metaloproteaz przez syntetyczne inhibitory peptydowe i niepeptydowe. Te pierwsze są analogami naturalnych substratów metaloproteaz i działają przez kompetycyjne hamowanie aktywności enzymatycznej. Na podstawie trzeciorzędowej struktury metaloproteaz opracowano szereg inhibitorów niebiałkowych, które selektywnie łączą się z ich domeną katalityczną i hamują wzrost, angiogenezę, inwazję i metastazę nowotworów [102].

Batimastat jest niskocząsteczkowym kwasem hydroksyaminowym, który jest analogiem kolagenu i kompetycyjnie hamuje aktywność wielu metaloproteaz. W badaniach na zwierzętach stwierdzono, że batimastat redukuje wzrost guza nowotworowego, hamował lokalną proteolizę, naciekanie przylegającej tkanki oraz metastazę [103]. Związek ten w nowotworach jajników powodował zmniejszenie masy guza o 90% oraz przedłużał siedmiokrotnie okres przeżycia pacjentów w porównaniu z grupą kontrolną, a w nowotworach sutka powodował zmniejszenie częstości przerzutów do płuc [104, 105]. Rozpuszczalnym odpowiednikiem batimastau jest marimastat stosowany w terapii nowotworów sutka, jajników, mózgu, płuc i trzustki [106]. Marimastat może zmniejszać o 90% zdolność komórek

nowotworowych do przekraczania ścian naczyń krwionośnych [107]. Do niebiałkowych inhibitorów metaloproteaz należy prinomastat, który selektywnie blokuje aktywność żelatynaz A i B, stromielizyny-1, metaloproteazy transbłonowej-1 i stosowany jest w nowotworach płuc i prostaty [106]. Prinomastat może powodować zahamowanie wzrostu guzów płuc, zmniejszenie liczby naczyń krwionośnych w guzie oraz zmniejszenie liczby przerzutów do kości i nerek [108]. Do selektywnych inhibitorów metaloproteaz należy pochodna kwasu butanowego BAY 12-9566, która hamuje aktywność żelatynaz A i B, stromielizyny-1, kolagenazy-3. BAY 12-9566 powoduje spadek tempa wzrostu guza oraz zmniejsza częstość przerzutów raków jelita grubego i sutka [109]. Struktura chemiczna niektórych syntetycznych inhibitorów metaloproteaz została przedstawiona na rysunku 4.

### VII-2. Terapia genowa

Przeprowadzono wiele eksperymentów z użyciem oligonukleotydów antysensowych blokujących transkrypcję genów MMP oraz z zastosowaniem transferu genów tkankowych inhibitorów metaloproteaz. Użycie oligonukleotydów antysensowych dla genu matrilizyny u myszy powodowało ograniczenie o 70% liczby przerzutów raka jelita grubego do wątroby [110]. W komórkach czerniaka transfekowanych plazmidem zdolnym do ekspresji transkryptu o długości 777 pz komplementarnego do genu *MMP-1* obserwowano spadek stopnia jego inwazyjności [111]. Transfer genu *TIMP-2* z użyciem adenowirusa do hepatocytów myszy z wszczepionymi komórkami raka jelita grubego powodował zmniejszenie o 95% liczby przerzutów do wątroby i ograniczył o 77% wzrost wtórnych ognisk nowotworowych w wątrobie [112]. Transfer genu *TIMP-1* do komórek śródbłonna spowodował zahamowanie zdolności do migracji *in vitro*, co sugeruje, że *in vivo* transfer tego genu może hamować angiogenezę, ograniczając w ten sposób wzrost guza [113]. Wyniki tych badań mogą być podstawą do opracowania strategii przeciwnowotworowej terapii genowej skierowanej na metaloproteazy, należy jednak pamiętać, że w progresji nowotworów biorą udział także białka układu aktywacji plazminogenu oraz katepsyny. W wielu nowotworach wykazano związek między podwyższonym poziomem składników układu aktywacji plazminogenu: uPA, uPAR, PAI-1, PAI-2, a progresją nowotworu oraz złym rokowaniem dla chorych [114, 115].



Ryc. 4 Struktura chemiczna wybranych syntetycznych inhibitorów metaloproteaz macierzowych



## VII. Uwagi końcowe

W świetle dotychczas otrzymanych wyników badań, zarówno klinicznych jak i doświadczalnych, metaloproteazy mogą być postrzegane jako białka mogące odgrywać istotną rolę w inwazji i metastazie nowotworów. Jednakże wiele z przytaczanych badań klinicznych zostało wykonanych na względnie niskiej liczbie próbek i przeważnie z analizą tylko jednej MMP. Istnieje zatem konieczność przeprowadzenia kompleksowych badań obejmujących wiele MMP i wykonanych na próbkach pochodzących od znacznej liczby pacjentów. Należy też rozwinąć techniki doświadczalne w badaniach MMP, w szczególności wyraźnie widać potrzebę konstrukcji przeciwciał pozwalających na odróżnienie MMP w postaci aktywnej od proenzymów oraz wolnych MMP i MMP związanych z inhibitorami tkankowymi. To, wraz z zastosowaniem jednoczesnej analizy wielu genów, na przykład przy użyciu mikroprocesorów DNA<sup>3</sup> (*DNA microarray, DNA chip*) może pozwolić na opracowanie inhibitorów MMP, które mogłyby być wykorzystane w terapii przeciwnowotworowej.

Artykuł otrzymano 19 lutego 2001 r.

Zaakceptowano do druku 25 czerwca 2001 r.

## Piśmiennictwo

1. Boyd D (1996) *Cancer Metastasis Rev* 15: 77-89
2. Błasiak J, Smolarz B, Piestrzeniewicz D (1999) *Post Biochem* 45: 42-49
3. Forget MA, Desrosiers RR, Beliveau R (1999) *Can J Physiol Pharmacol* 77: 465-480
4. Curran S, Murray GI (1999) *J Pathol* 189: 300-308
5. McDougall JR, Matrisian LM (1995) *Cancer Metastasis Rev* 14: 351-362
6. Ellerbroek SM, Stack MS (1999) *BioEssay* 21: 940-949
7. Hirose T, Patterson C, Pourmotabbed T, Mainardi CL, Hasty KA (1993) *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 2569-2573
8. Shiplay JM, Doyle GA, Fliszar CJ, Ye QZ, Johanson LL, Shapiro SD, Welgus HG, Senior RM (1996) *J Biol Chem* 271: 4335-4341
9. Yang M, Murray MT, Kurkinen M (1997) *J Biol Chem* 272: 13527-13533
10. Gururajan R, Grenet J, Lahti JM, Kidd VJ (1998) *Genomics* 15: 101-106
11. Collier IE, Brauns GAP, Goldberg GI, Gerhard DS (1991) *Genomics* 9: 429-434
12. Massova I, Kotra LP, Fridman R, Mobashery S (1998) *FASEB J* 12: 1075-1095
13. Rooney PH, Murray GI, Stevenson DAJ, Haites NE, Cassidy J, McLeod HL (1999) *Br J Cancer* 80: 862-873
14. Mignatti P, Tsuboi R, Robbins E (1989) *J Cell Biol* 108: 671-678
15. Unemori EN, Ferrara N, Baurer EA (1991) *J Cell Physiol* 153: 557-562
16. Lund LR, Romer J, Bugge TH, Nielsen BS, Frandsen TL, Degen JL, Stephens RW, Dano K (1999) *EMBO J* 18: 4645-4656
17. Silverman ES, Collins T (1999) *Am J Pathol* 154: 665-670
18. Haas TL, Madri JA (1999) *Trends Cardiovasc Med* 9: 70-77
19. Rutter JL, Mitchell TI, Buttice G, Meyers J, Gussella JF, Ozelius LJ, Brinkerhoff CEA (1998) *Cancer Res* 58: 5321-5325
20. Weber Z *Cell* (1997) 91: 439-442
21. Descheemaeker KA, Wyns S, Nelles L, Auverx J, Ny T, Collen D (1992) *J Cell Biol* 267: 49-56
22. Westermarck J, Kahari WM (1999) *FASEB J* 13: 781-792
23. Meller D, Li DQ, Tseng SC (2000) *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41: 2922-2929
24. Crawford HC, Matrisian LM (1996) *Enzyme Protein* 49: 20-37
25. Haas TL, Davis SJ, Madri JA (1998) *J Biol Chem* 273: 3604-3610
26. Huhtala P, Humphries MJ, McCarthy JB, Tremble PM, Werb Z, Damsky CH (1995) *J Cell Biol* 129: 867-879
27. Vincenti MP, White LA, Schroen DJ, Benbow U, Brinkerhoff CE (1996) *Crit Rev Eukaryot Gene Exp* 6: 391-411
28. Schroen DJ, Brinkerhoff CE (1996) *Gene Express* 6: 197-207
29. Murphy G, Knäuper V, Atkinson S, Gavrilovic J, Edwards D (2000) *Fibrinolysis Proteolysis* 14: 165-174
30. Birkedal-Hansen H (1995) *Curr Opin Cell Biol* 7: 728-735
31. Lim YT, Sugiura Y, Laug WE, Sun B, Garcia A, DeClerck YA (1996) *J Cell Physiol* 167: 333-340
32. Ogata Y, Enghild JJ, Nagase H (1992) *J Biol Chem* 267: 3581-3584
33. Okada Y (1995) *J Biol Chem* 270: 6691-6697
34. Nagase H (1997) *Biol Chem* 378: 151-160
35. Lijnen HR and Collen (1999) *Thrombos Haemostas* 82: 837-845
36. Polette M, Birembaut P (1998) *Int J Biochem Cell Biol* 30: 1195-1202
37. Pei D, Weiss SJ (1995) *Nature* 375: 244-247
38. Okumura Y, Sato H, Seiki M, Kido H (1997) *FEBS* 402: 181-184
39. Deryugina EI, Reisfeld RA, Bourdon MA (1998) *Proc Am Assoc Cancer Res* 39: 82
40. Seiki M (1999) *APMIS* 107: 137-143
41. Imai K, Ohuchi E, Aoki T, Nomura H, Fujii Y, Sato H, Seiki M, Okada Y (1996) *Cancer Res* 56: 2707-2710
42. Denhardt DT, Feng B, Edwards DR, Cocuzzi ET, Malyankar UM (1996) *Pharmacol Ther* 59: 329-341
43. Rey JM i Stetler-Stevenson WG (1995) *Ann NY Acad Sci* 732: 233-247
44. Roeb E, Rose-John S, Erren A, Edwards DR, Martens S, Graeve L, Heinrich PC (1995) *FEBS Lett* 349: 45-49
45. Brew K, Dinakarandian D, Nagase H (2000) *Biochim Biophys Acta* 7: 267-283
46. Williamson RA, Martson FAO, Angal S (1990) *Biochem J* 268: 267-274
47. Taylor KB Windsor LJ, Caterina NCM, Bodden MK, Engler JA (1996) *J Biol Chem* 271: 23 938-23 945

<sup>3</sup>Mikroprocesory DNA zostały omówione w *Postęпах Biochemii* 46(4)2000



48. Howard EW, Bullen EC, Banda MJ (1991) *J Biol Chem* **266**: 13064-13069
49. Goldberg GI, Marmer BL, Grant GA (1989) *Proc Natl Acad Sci USA* **86**: 8207-8211
50. McDonnell S, Morgan M, Lynch C (1999) *Bioch Soc Trans* **27**: 734-740
51. Moses MA (1997) *Stem Cells* **15**:180-189
52. Mignatti P, Tsuboi R, Robbins E (1989) *J Cell Biol* **108**: 671-678
53. Unemori EN, Ferrara N, Baurer EA (1991) *J Cell Physiol* **153**: 557-562
54. Grondahl-Hansen J, Lund LR, Ralfkier E, Otevang V, Dano K (1988) *J Invest Dermatol* **90**: 790-795
55. Lund LR, Romer J, Bugge TH, Nielsen BS, Frandsen TL, Degen JL, Stephens RW, Dano K (1999) *EMBO J* **18**: 4645-4656
56. Salamonsen LA, Woolley DE (1996) *Hum Reprod* **11**: 124-133
57. Osteen KG, Keller NR, Feltus FA, Melner MH (1999) *Gynecol Obstet Invest* **1**: 2-13
58. Tsafiriri A (1995) *Adv Exp Med Biol* **377**: 121-140
59. Librach CL, Werb Z, Fitzgerald ML, Chiu K, Corwin NM, Esteves RA, Grobelny D, Galardy R, Damsky CH, Fisher SJ (1991) *J Cell Biol* **113**: 437-449
60. Werb Z, Chin JR (1998) *Ann NY Acad Sci* **23**: 110-118
61. Hill PA, Murphy G, Docherty AJ, Hembry RM, Millican TA, Reynolds JJ, Meikle MC (1994) *J Cell Sci* **107**: 3055-3064
62. Reponen P, Sahlberg C, Munaut C, Thesleff I, Tryggvason K (1994) *J Cell Biol* **124**: 1091-1102
63. Ryan ME, Ramamurthy S, Golub LM (1996) *Curr Opin Periodontol* **3**: 85-96
64. Bartlett JD, Simmer JP (1999) *Crit Rev Oral Biol Med* **10**: 425-441
65. Smolarz B, Błasiak J, Kulig A (2000) *Post Bioch* **46**: 261-270
66. Shima I, Sasaguri Y, Kusukawa J (1992) *Cancer* **70**: 2747-2753
67. Murray GI, Duncan ME, O'Neil P, McKay JA, Melvin WT, Fothergill JE (1998) *J Pathol* **185**: 256-261
68. Nomura H, Sato H, Seiki M, Mai M, Okada Y (1995) *Cancer Res* **55**: 3263-3266
69. Sier CFM, Kubben FJGM, Ganesh S (1996) *Br J Cancer* **74**: 413-417
70. Yamashita K, Azumano I, Mai M, Okada Y (1998) *Int J Cancer* **79**: 187-194
71. Zeng ZS, Huang Y, Cohen AN, Guillem JG (1996) *J Clin Oncol* **14**: 3133-3140
72. Murray GI, Duncan ME, O'Neil P, Melvin WT, Fothergill JE (1996) *Nature Med* **2**: 461-462
73. Bramhall SR, Stamp GW, Dunn J, Lemoine NR, Neoptolemos JP (1996) *Br J Cancer* **73**: 972-978
74. Basset P, Bellocq JP, Wolf C (1990) *Nature* **348**: 699-704
75. Rouyer N, Wolf C, Chenart MP (1995) *Invasion Metastasis* **14**: 269-275
76. Talvensaaari-Mattila A, Paakko P, Hoyhtya N, Blanco-Sequeiros G, Turpeenniemi-Hujanen T (1998) *Cancer* **83**: 1153-1162
77. Iwata H, Kobayashi S, Iwase H, Masaoka A, Fujimoto N, Okada Y (1996) *Jpn J Cancer Res* **87**: 602-611
78. Stearns M, Stearns ME (1996) *Oncol Res* **8**: 69-75
79. Auto-Hermainen H, Karttunen T, Hurskainen Hoyhtya M, Kauppila A, Tryggvason K (1993) *Lab Invest* **69**: 312-321
80. Tokuraku M, Sato H, Murakami S, Okada Y, Watanabe Y, Seiki M (1995) *Int J Cancer* **64**: 355-359
81. Kawamata H, Kawai K, Kameyama S, Johanson MD, Stetler-Stevenson WG, Oyasu R (1995) *Int J Cancer* **63**: 680-87
82. Wilson CL, Happner KJ, Labosky PA, Hogan BLM, Matrisian LM (1997) *Proc Natl Acad Sci USA* **94**: 1402-7
83. Heppner Goss KJ, Brown PD, Matrisian LM (1998) *Int J Cancer* **78**: 629-35
84. Arribas J, Coodly L, Vollmer P, Kishimoto TK, Rosejohn S, Massague J (1996) *Boil Chem* **271**: 11376-82
85. Levi E, Fidman R, Miao H, Ma Y, Yayon A, Vlodavsky I (1996) *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 7069-74
86. Dempsey P., Meise K, Yoshitake Y, Nishikawa K, Coffey R (1997) *J Cell Biol* **138**: 747-58
87. Suzuki M., Raab G, Moses M., Fernandes C, Klagsbrun M. (1997) *J Biol Chem* **272**: 31730-37
88. Strater J, Wedding U, Barth TF, Koretz K, Elsing C, Moller P. (1996) *Gastroenterology* **110**: 1776-84
89. Frish SM, Francis H (1994) *J Cell Biol* **124**: 619-26
90. Lochter A, Galosy S, Muschler J, Freedman N, Werb Z, Bissell M. (1997) *J Cell Biol* **139**: 1861-72
91. StCroix B, Sheehan C, Rak J, Florenes V, Slingerland J, Kerbel R (1998) *J Cell Biol* **142**: 557-71
92. Brooks PC, Silletti S, von Schalsha TL, Friedlander M, Cheresch DA (1998) *Cell* **92**: 391-400
93. Schnaper HW, Grand DS, Stetler-Stevenson WG, Fridman R, Orazi G, Murphy AN, Bird RE, Hoythya M, Fuerst TR, French DL, Quigley JP, Kleinmann HK (1993) *J Cell Physiol* **156**: 235-246
94. Stearns M (1998) *Cancer Res* **58**: 1048-1051
95. Curran S, Murray GI (2000) *Eur J Cancer* **33**: 1621-1630
96. Chen WT, Wang JY (1999) *Ann NY Acad Sci* **878**: 361-371
97. Brooks PC, Strömlblad S, Sanders LC, von Schalsha TL, Aimes RT, Stetler-Stevenson WG, Quigley JP Cheresch DA (1996) *Cell* **85**: 683-693
98. Howard EW, Bullen EC, Banda MJ (1991) *J Biol Chem* **266**: 13064-13069
99. Sugiura T, Berditchevski F (1999) *J Cell Biol* **146**: 1375-1389
100. Agrez M, Gu X Turton J (1999) *Int J Cancer* **81**: 90-97
101. Yu Q, Stamenkovic I (1999) *Genes Dev* **13**: 35-48
102. Nelson BAR, Fingleton B, Rothenberg ML, Matrisian LM (2000) *J Clin Oncol* **18**: 1135-1149
103. Wang X, Fu X, Brown PD (1994) *Cancer Res* **54**: 4726-4728
104. Davies B, Brown PD, East N (1993) *Cancer Res* **93**: 2087-2091
105. Sledge GWJ, Qulali M, Goulet R (1995) *J Natl Cancer Inst* **87**: 1546-1550
106. Heath EI, Grochow LB (2000) *Drugs* **59**:1043-1055
107. Kim J, Yu W, Kovalski K (1998) *Cell* **94**: 353-362
108. Price A, Shi Q, Morris D (1999) *Clin Cancer Res* **5**: 845-854
109. Nozaki S, Sissons S, Casazza AM (1998) *Proc Am Assoc Cancer Res* **39**: 301
110. Hasegawa S, Koshikawa N, Momiyama N, Moriyama K, Ichikawa Y, Ishikawa T, Mitsushashi M, Shimada H, Miyazaki K (1998) *Int J Cancer* **76**: 812-816
111. Durko M, Navab R, Shibata HR, Brodt P (1997) *Biochim Biophys Acta* **1356**: 271-280
112. Brand K, Baker AH, Perez-Canto A, Possling A, Sacharjat M, Geheeb M, Arnold W (2000) *Cancer Res* **60**: 5723-5730
113. Fernandez HA, Kallenbach K, Seghezzi G, Grossi E, Colvin S, Schneider R, Mignatti P, Galloway A (1999) *J Surg Res* **82**:156-162
114. Carroli VA, Binder BR (1999) *Sem Thromb Haemost* **25**: 183-197
115. Błasiak J, Smolarz B, Kubryn I, Dziki A, Ulańska J, Pander B (2000) *Exp Oncol* **22**: 48-51

# ROLA KATEPSYNY D W PROGRESJI NOWOTWORÓW

## THE ROLE OF CATHEPSIN D IN CANCER PROGRESSION

MAREK CYBULSKI<sup>1</sup>, HENRYK BERBEĆ<sup>2</sup>

### Spis treści:

- I. Wprowadzenie
- II. Klasyfikacja katepsyn
- III. Charakterystyka genu kodującego katepsynę D
- IV. Charakterystyka katepsyny D
  - IV-1. Biosynteza i dojrzewanie katepsyny D
  - IV-2. Fizjologiczne działanie katepsyny D
  - IV-3. Udział katepsyny D w procesach patologicznych
- V. Katepsyna D jako wskaźnik rozwoju choroby nowotworowej

### Contents:

- I. Introduction
- II. Classification of cathepsins
- III. Characteristics of the cathepsin D gene
- IV. Characteristics of cathepsin D
  - IV-1. Biosynthesis and maturation of cathepsin D
  - IV-2. Physiological functions of cathepsin D
  - IV-3. Role of cathepsin D in human pathology
- V. Cathepsin D as tumour marker

**Wykaz stosowanych skrótów:** bFGF — zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów; ECM — macierz zewnątrzkomórkowa; EGF — naskórkowy czynnik wzrostu; IGF I — insulinopodobny czynnik wzrostu I; IGF II — insulinopodobny czynnik wzrostu II; IGFbps — białka wiążące insulinopodobne czynniki wzrostu; IHCH — immunohistochemia; IRMA — metoda immunoradiometryczna; KD — katepsyna D; MHC-II — antygeny głównego układu zgodności tkankowej klasy II; PAI — inhibitory aktywatorów plazminogenu; PN1 — proteaza neksyna-1 (ang. *protease nexin-1*); RIA — metoda radioimmunologiczna; TGF- $\alpha$  — transformujący czynnik wzrostu  $\alpha$ ; TIMP — tkankowe inhibitory metaloproteaz; tPA — tkankowy aktywator plazminogenu; uPA — aktywator plazminogenu typu urokinazowego

### I. Wprowadzenie

Katepsyna D (EC 3.4.23.5) jest endopeptydazą aspartylową występującą w lizosomach komórek organizmów eukariotycznych. Duże zainteresowanie tym enzymem wynika ze znanego udziału proteaz w inwazji nowotworów i w powstawaniu przerzutów

[1]. Pomimo ciągłego doskonalenia metod leczenia guzów pierwotnych za pomocą zabiegu operacyjnego, chemo- i radioterapii, wciąż dużą trudność sprawia zahamowanie powstawania przerzutów. Dlatego też niezwykle ważne jest poznanie zmian enzymatycznych towarzyszących procesom nowotworowym.

Liczne proteazy zaangażowane są w istotny dla inwazji nowotworowej i powstawania przerzutów proces degradacji składników macierzy zewnątrzkomórkowej (ECM) i błony podstawnej. Do proteaz tych zaliczamy: proteazę aspartylową — katepsynę D, katepsyny B i L (proteazy cysteinowe), proteazy urokinazowego szlaku aktywacji plazminogenu (proteazy serynowe) oraz metaloproteazy. Wykazano, że inhibitory proteaz cysteinowych, serynowych i metaloproteaz mają zdolność hamowania inwazji nowotworów, jednak nie znalazły one zastosowania w terapii ze względu na ich toksyczność [2, 3]. Degradacja składników macierzy zewnątrzkomórkowej jest uwarunkowana stopniem aktywacji proteaz i stężeniem ich endogennych inhibitorów. Udowodniono, że katepsyna D trawi składniki macierzy zewnątrzkomórkowej i błony podstawnej, przyczynia się ponadto do wzrostu nowotworów pobudzając proliferację komórek [4-7]. Rola proteaz cysteino-

<sup>1</sup>Dr n. med., <sup>2</sup>dr hab., Katedra i Zakład Biochemii i Biologii Molekularnej Akademii Medycznej w Lublinie, ul. Lubartowska 85, 20-123 Lublin, tel. (081) 740-58-45, e-mail: marekc@hipokrat.es.lublin.pl

wych w nowotworzeniu była badana przez wiele zespołów, a niedawno została omówiona na łamach *Postępów Biochemii* (tom 46, nr 1, 2000 r.).

## II. Klasyfikacja katepsyn

Katepsyny najaktywniej degradują białka w kwaśnym środowisku. Enzymy te obecne są we wszystkich tkankach, a w szczególnie wysokich ilościach można je znaleźć w nerkach, wątrobie, śledzionie i makrofagach. Zgodnie z klasyfikacją Międzynarodowej Unii Biochemii i Biologii Molekularnej (IUBMB), katepsyny stanowią grupę lizosomalnych endopeptydaz komórek zwierzęcych, które w zależności od mechanizmu działania, budowy centrum aktywnego, optimum pH i ich autogennych inhibitorów, przydzielono do odpowiednich pod-podklas (Tabela 1). Dwie z lizosomalnych proteaz, które

## III. Charakterystyka genu kodującego katepsynę D

W organizmie człowieka gen katepsyny D występuje na końcu krótkiego ramienia chromosomu 11 (11p15.5) w pobliżu onkogenu H-ras [8]. Gen składa się z 9 eksonów i liczy 11106 par zasad [9]. Transkrypcja genu katepsyny D prowadzi do wytworzenia mRNA zawierającego 1988 zasad. Stwierdzono, że ekspresja genu katepsyny D jest regulowana przez hormony sterydowe, czynniki wzrostu (IGF-I, TGF- $\alpha$  i EGF) i kwas retinowy [10-13]. W sutku estrogeny zwiększają syntezę mRNA katepsyny D poprzez oddziaływanie z sekwencjami odpowiedzi na estrogeny (ang. *estrogen responsive elements*) obecnymi w obrębie promotora [10]. Natomiast w endometrium progesteron pobudza ekspresję genu katepsyny D [13].

**Tabela 1**

Klasyfikacja katepsyn wg Międzynarodowej Unii Biochemii i Biologii Molekularnej

Nazwa katepsyny	Numer EC	Przynależność do pod-podklasy proteaz
Katepsyna X	3.4.18.1	3.4.18 – karboksypeptydazy typu cysteinowego *
Katepsyna G	3.4.21.20	3.4.21 – endopeptydazy serynowe
Katepsyna B	3.4.22.1	3.4.22 – endopeptydazy cysteinowe
Katepsyna L	3.4.22.15	
Katepsyna H	3.4.22.16	
Katepsyna T	3.4.22.24	
Katepsyna S	3.4.22.27	
Katepsyna K	3.4.22.38	
Katepsyna F	3.4.22.41	
Katepsyna O	3.4.22.42	
Katepsyna V	3.4.22.43	
Katepsyna D	3.4.23.5	3.4.23 – endopeptydazy aspartylowe
Katepsyna E	3.4.23.34	

\* – katepsyna X wykazuje także słabą aktywność endopeptydazową

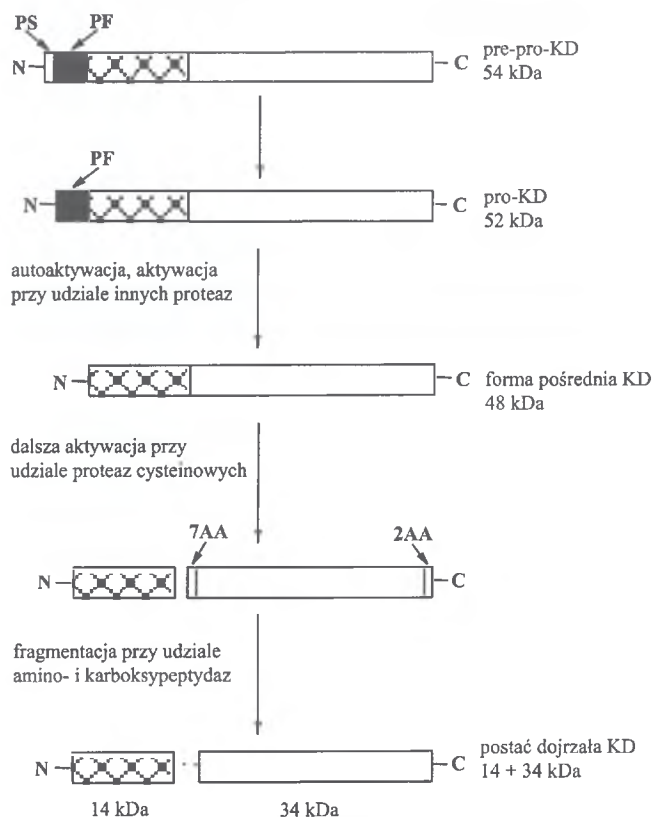
początkowo kwalifikowano do grupy katepsyn (katepsyna A i C) zidentyfikowano później jako egzopeptydazy i zgodnie z obowiązującą klasyfikacją ich nazwy zostały zmienione. Katepsynę A zaliczono do pod-podklasy karboksypeptydaz typu serynowego jako karboksypeptydazę C (EC 3.4.16.5), natomiast katepsynę C do pod-podklasy peptydaz di- i tripeptydylowych jako peptydazę dipeptydylową I (EC 3.4.14.1).

## IV. Charakterystyka katepsyny D

### IV-1. Biosynteza i dojrzewanie katepsyny D

Proces syntezy i dojrzewania katepsyny D został dość dokładnie poznany (Ryc. 1). Enzym jest syntezowany w postaci pre-pro-KD o masie 54 kDa (412 aminokwasów). W czasie dojrzewania N-końcowy prefragment (20 aminokwasów) jest odcinany, po-





Ryc. 1. Biosynteza i dojrzewanie katepsyny D. Objaśnienia: PS — peptyd sygnałowy, PF — profragment.

wstaje prokatepsyna D o masie cząsteczkowej 52 kDa (392 aminokwasy) [14, 15], która następnie podlega glikozylacji w siateczce śródplazmatycznej. W procesie glikozylacji dochodzi do przyłączenia do proenzymu za pośrednictwem reszt asparaginy dwóch łańcuchów oligosacharydowych zawierających reszty *N*-acetylglukozaminy, mannozy i glukozy ( $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ ). Następnie 3 końcowe reszty glukozy zostają usunięte, co stanowi sygnał do przeniesienia prokatepsyny D do aparatu Golgiego [16], gdzie reszty mannozy łańcuchów oligosacharydowych ulegają fosforylacji do mannozo-6-fosforanu (M6P). Dzięki obecności reszt M6P, prokatepsyna D jest wiązana przez obecne w aparacie Golgiego receptory mannozo-6-fosforanu i transportowana do lizosomów. Środowisko kwaśne lizosomów powoduje dysocjację kompleksu proenzym-receptor, prokatepsyna D pozostaje w lizosomach, natomiast receptor powraca do aparatu Golgiego i może przenosić kolejne cząsteczki prokatepsyny D [1, 17, 18]. W lizosomach, na drodze autoaktywacji lub przy udziale innych proteaz następuje odszczepienie *N*-końcowego profragmentu (44 aminokwasy) z wytworzeniem jednołańcuchowej formy pośredniej enzymu o masie cząsteczkowej 48 kDa (348 aminokwasów) [19]. W wyniku działania proteaz cysteino-

wych oraz amino- i karboksypeptydaz dochodzi do wytworzenia dwułańcuchowej postaci dojrzałej katepsyny D o masie cząsteczkowej 48 kDa (339 aminokwasów), złożonej z łańcucha lekkiego 14 kDa i łańcucha ciężkiego 34 kDa [1]. Za postacię biologicznie aktywne uważa się formę pośrednią i dojrzałą.

## IV-2. Fizjologiczne działanie katepsyny D

Katepsynę D wyizolowano z wątroby [20], łożyska [21], płynu owodniowego [22], leukocytów [23], mózgu [24] i śledziony człowieka [25]. Stwierdzono, że enzym swoiście rozkłada wiązania peptydowe utworzone przez aminokwasy hydrofobowe, zwłaszcza aromatyczne. W badaniach *in vitro* wykazano, że enzym degraduje liczne białka: hemoglobinę, albuminę, kazeinę,  $\beta$ -lipoproteinę [26], metalotioneinę [27] oraz składniki macierzy zewnątrzkomórkowej: fibronektynę, proteoglikany [28,29], kolagen [30] i białko błony podstawnej — lamininę [31]. Enzym wykazuje największą aktywność w pH 2,8-4,0. Specyficznym inhibitorem katepsyny D jest heksapeptyd pepstatyna wytwarzany przez szczepy bakterii (*Actinomycetes* — promieniowce) [32]. Dotychczas nie znaleziono swoistego dla katepsyny D inhibitora tkankowego [1]. Centrum aktywne katepsyny D ma budowę podobną do centrum aktywnego pepsyny, zawiera dwie reszty kwasu asparaginowego [33].

Katepsyna D bierze udział w różnych zjawiskach fizjologicznych. Stwierdzono, że enzym ten bierze udział w katabolizmie białek zarówno wewnątrzkomórkowych jak i zewnątrzkomórkowych pobranych drogą endocytozy [32]. Katepsyna D jest odpowiedzialna za aktywację i katabolizm innych enzymów proteolitycznych oraz hormonów białkowych. Stwierdzono, że enzym ten bierze udział w proteolizie parathormonu prowadzącej do wytworzenia aktywnych hormonalnie oligopeptydów [34], w aktywacji prokatepsyn B [35] i L [36], w proteolizie  $\beta$ -endorfin prowadzącej do wytworzenia  $\gamma$ -endorfin [37], w proteolizie proreniny [38], w uwalnianiu angiostatyny z plazminogenu [39], a także w wybiórczej inaktywacji inhibitorów proteaz takich jak niektóre cystatyny [40] i  $\alpha$ 1-antychymotrypsyna [41]. Enzym ten bierze także udział w remodelowaniu i odnowie tkanek, przypuszczalnie dzięki uwalnianiu czynników wzrostu potrzebnych do proliferacji komórek i inaktywacji inhibitorów wzrostu [42]. Katepsyna D odgrywa też rolę w procesie apoptozy. Prawdopodobnie enzym bierze udział w tym procesie aktywując prokaspazę 3 [43] i prokaspazę 8 [44]. Katepsyna D współdziała z dzikim białkiem p53 w

indukcji apoptozy w komórkach raka jelita grubego, wątroby i jajnika [45]. Do fizjologicznych funkcji katepsyny D należy również ograniczona proteoliza antygenów białkowych w celu ich prezentacji przez cząstki MHC-II [46].

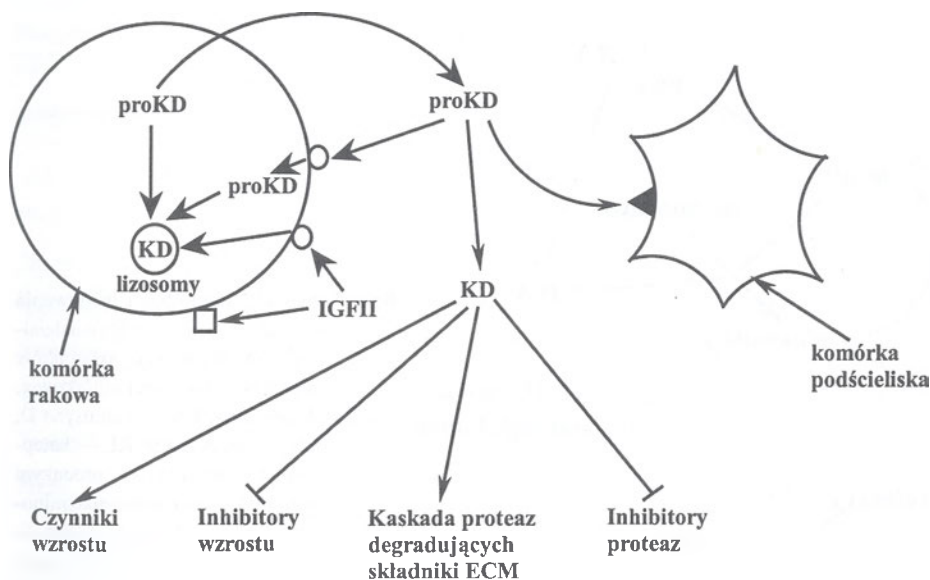
### IV-3. Udział katepsyny D w procesach patologicznych

Istnieją dowody na udział katepsyny D w licznych procesach patologicznych. W literaturze najwięcej doniesień na ten temat wiąże się z badaniem udziału tego enzymu w rozwoju choroby nowotworowej. Inne procesy patologiczne, w których ważną rolę przypisuje się katepsynie D, to dystrofia mięśniowa [47], marskość wątroby [48], choroby zapalne stawów [49], a także choroba Alzheimera [50].

dzącego z raka sutka, co tłumaczone jest różną glikozylacją enzymu. Na tej podstawie przypuszcza się, że zmiany w glikozylacji enzymu mogą mieć związek z progresją nowotworu na skutek zmiany powinowactwa enzymu do naturalnych substratów [53].

Szczególnie interesująca jest rola katepsyny D w procesie inwazji nowotworowej i w powstawaniu przerzutów. Uważa się, że w tych procesach katepsyna D uaktywnia kaskadę proteaz trawiących błonę podstawną i składniki macierzy zewnątrzkomórkowej oraz pobudza proliferację komórek. Na rycinie 2 przedstawiono mechanizmy działania różnych form molekularnych katepsyny D w progresji nowotworów.

W komórkach prawidłowych prokatepsyna D ulega w lizosomach przekształceniu w formę pośrednią (jednołańcuchową), a później w aktywną formę



→ aktywacja, —| hamowanie, → transport,  
 ◀ - receptor dla profragmentu prokatepsyny D, ○ - receptory dla mannozo-6-fosforanu,  
 ◻ - receptor dla IGFII

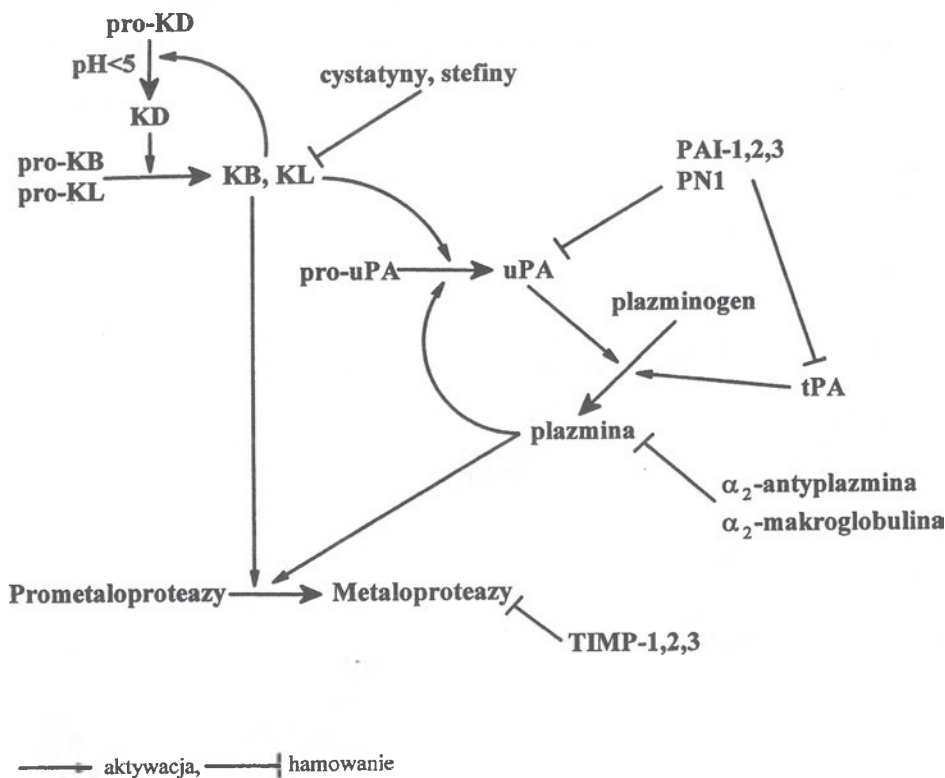
Ryc. 2. Przekształcenia w obrębie różnych form molekularnych katepsyny D i udział tych form w procesie progresji nowotworów. Objasnienia: proKD — prokatepsyna D, IGFII — insulinopodobny czynnik wzrostu II, bFGF — zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów, IGFbps — białka wiążące insulinopodobne czynniki wzrostu

Wykazano, że katepsyna D katalizuje kaskadę przemian enzymatycznych towarzyszących progresji licznych nowotworów. Enzym ten wyizolowano z guzów nowotworowych i stwierdzono, że zwykle nie różni się on od enzymu z tkanek prawidłowych. Jednak w katepsynie wyizolowanej z komórek linii MCF 7 oraz z wątrobiaka zaobserwowano zmiany w glikozylacji enzymu polegające na zwiększonej zawartości kwasu sjałowego [51] i reszt fosforanowych [52]. Katepsyna D wyizolowana z raka prostaty wykazuje większą zdolność do uwalniania angiostatyny z plazminogenu w porównaniu do enzymu pocho-

dwułańcuchową. Uważa się, że nadmierna ekspresja genu katepsyny D w komórkach nowotworowych zwiększa produkcję prokatepsyny D powodując przeciążenie drogi transportu proenzymu do lizosomów i wydzielanie proenzymu do przestrzeni pozakomórkowej [51]. W przestrzeni zewnątrzkomórkowej, w obniżonym pH środowiska, nieaktywny proenzym może ulegać autoaktywacji do postaci jednołańcuchowej [1]. Stwierdzono, że w guzach nowotworowych dochodzi do obniżenia pH środowiska, co powoduje zmiany aktywności różnych enzymów, w tym proteolitycznych [1]. W procesie obniżania

pH biorą udział takie czynniki jak ograniczenie transportu tlenu prowadzące do zwiększonej produkcji kwasu mlekowego, wzrost aktywności  $H^+$ /ATP-az błonowych oraz zwiększona zawartość kwasu sjałowego w łańcuchach oligosacharydowych glikoprotein i glikolipidów błon komórek nowotworowych. Proces autoaktywacji proenzymu w przestrzeni pozakomórkowej polega na całkowitym usunięciu profragmentu (44 aminokwasy) prokatepsyny D lub jego skróceniu [1]. Wytworzona w ten sposób aktywna forma katepsyny D uczynnia liczne proteazy degradujące błonę podstawną i składniki macierzy zewnątrzkomórkowej (Ryc. 3). W procesie tym ulegają aktywacji kolejno prokatepsyny B i L, aktywator

organizmu przed nadmierną proteolizą są autogenne inhibitory proteaz. W wielu guzach nowotworowych, obok zwiększonej aktywności proteaz, stwierdza się zwiększoną zdolność do wytwarzania ich swoistych inhibitorów. Okazało się, że katepsyny B i L są hamowane przez autogenne cystatyny, stefiny i kininogeny. Aktywatory plazminogenu (uPA i tPA) są hamowane przez inhibitory aktywatorów plazminogenu (PAI-1,2,3) i proteazę PN1 (ang. *protease nexin-1*). Plazmina jest hamowana przez  $\alpha_2$ -makroglobulinę i  $\alpha_2$ -antyplazminę. Metaloproteazy są hamowane przez swoiste tkankowe inhibitory metaloproteaz (TIMP-1,2,3) [3]. Katepsyna D ma zdolność do inaktywacji niektórych inhibitorów proteaz (np.



Ryc. 3. Schemat aktywacji i hamowania kaskady proteaz odpowiedzialnych za degradację składników macierzy zewnątrzkomórkowej. Objasnienia: KD — katepsyna D, KB — katepsyna B, KL — katepsyna L, pro-uPA — proenzym uPA, uPA — aktywator plazminogenu typu urokinazowego, tPA — tkankowy aktywator plazminogenu, PAI -1,2,3 — inhibitory aktywatorów plazminogenu, PN1 — proteaza neksyna-1 (protease nexin-1), TIMP-1,2,3 — tkankowe inhibitory metaloproteaz

tory plazminogenu, plazmina i metaloproteazy. Katepsyna D uruchamia kaskadę proteaz aktywując katepsyny B i L, które z kolei aktywują aktywator plazminogenu typu urokinazowego (uPA), a ten aktywuje plazminogen. Zaktywowane katepsyny B i L uczynniają prometaloproteazy i aktywator plazminogenu (pro-uPA). Z kolei aktywne katepsyny, plazmina i metaloproteazy powodują bezpośrednią degradację takich składników macierzy zewnątrzkomórkowej jak kolagen, laminina i fibronektyna. Niszcząc tkanki gospodarza enzymy przygotowują miejsce dla rozrastającego się nowotworu i ułatwiają migrację komórek nowotworowych do naczyń krwionośnych lub limfatycznych, co sprzyja tworzeniu przerzutów. Czynniki chroniącymi tkanki or-

cystatyn [40] i  $\alpha_1$ -antychymotrypsyny [41]). Naruśnienie równowagi pomiędzy proteazami degradującymi składniki macierzy zewnątrzkomórkowej oraz ich inhibitorami doprowadza do rozwoju procesów patologicznych, w tym nowotworów.

Wykazano, że katepsyna D ma zdolność do pobudzenia proliferacji komórek. Działanie to może wynikać z oddziaływania prokatepsyny D z receptorem IGF-II/M6P (kationo-niezależny receptor mannozo-6-fosforanu), który jest receptorem wiążącym także czynnik wzrostu IGF-II. Receptory IGF-II/M6P odpowiadają za kontrolę pozakomórkowego poziomu IGF-II. Receptory IGF-II/M6P występują na ogół wewnątrz komórki, gdzie biorą udział w transporcie nowo syntezowanych enzymów lizosomalnych do li-



zosomów. Niektóre receptory IGF-II/M6P przemieszczają się pomiędzy lizosomami a błoną komórkową. Receptory te, obecne w błonie komórkowej, biorą udział w internalizacji pozakomórkowych enzymów lizosomalnych i czynnika wzrostu IGF-II i transportują je do lizosomów [1]. W wielu nowotworach dochodzi do wysycenia receptora IGF-II/M6P przez prokatepsynę D co prowadzi do zaburzenia kontroli poziomu IGF-II [1], powodując zwiększoną dostępność tego czynnika wzrostu dla jego własnych receptorów błonowych. Ponadto działanie mitogenne katepsyny D może wynikać z aktywacji i/lub uwalniania z macierzy zewnątrzkomórkowej czynników wzrostu. Stwierdzono na przykład, że katepsyna D ma zdolność uwalniania z macierzy zewnątrzkomórkowej zasadowego czynnika wzrostu fibrobla-

katepsyna D umożliwia oddziaływanie tych czynników z receptorami komórkowymi [4]. Działanie mitogenne katepsyny D może także wynikać z oddziaływania prokatepsyny D z receptorami komórkowymi innymi niż receptory mannozo-6-fosforanu. Proenzym katepsyny D wiąże się prawdopodobnie z bliżej nie zdefiniowanymi receptorami obecnymi w błonie komórkowej za pomocą profragmentu (44 aminokwasy), pobudzając proliferację [6, 7].

Bezpośrednich dowodów przemawiających za udziałem katepsyny D w procesie inwazji i w tworzeniu przerzutów dostarczyły badania Garcia i wsp. [57]. Autorzy ci dokonali transfekcji cDNA genu ludzkiej katepsyny D do linii komórek szczura (3Y1-Ad12). Transfekowane klony komórkowe, które wytwarzały w nadmiarze ludzki enzym, wykazy-

**Tabela 2**

Katepsyna D jako wskaźnik prognostyczny w chorobie nowotworowej (na podstawie piśmiennictwa za lata 1990-2000)

Lokalizacja nowotworu	Zmiany poziomu KD w surowicy krwi	Zmiany poziomu KD w ekstraktach z guzów	Zmiany zawartości KD w komórkach guzów
Sutek	↑[58]	↑[59]	↑[60, 61]
Szyjka macicy			↑[62]
Jajnik		↑[64]	↑[63,64]
Endometrium		↑[66]	↑[65]
Prostata		↑[67], bez zmian [69]	↑[67,68]
Mózg		↑[70]	↑[71]
Tarczycza		↑[72,73]	↑[74]
Krtąń		↑[75]	↑[76]
Wątroba	↑[48, 77]		
Żołądek		↑[79], bez zmian [78]	↑[80,81]
Jelito grube		↑[82]	↑[83-85]
Oskrzela			↑[86,87]
Skóra (czerniak złośliwy)	↑[88]	↑[90]	↑[89]
Głowa i szyja (rak płaskonabłonkowy)	↑[91]	↑[91, 92]	↑[93]

stów (bFGF). Czynniki ten odgrywa ważną rolę w rozwoju nowotworów dzięki stymulacji neoangiogenezy [55]. Wykazano, że produkty trawienia przez katepsynę D fibronektyny pobudzają syntezę DNA w fibroblastach [56]. Przypuszcza się, że katepsyna D pobudza proliferację komórek rakowych poprzez inaktywację inhibitorów wzrostu [4] i hamowanie wydzielania inhibitorów wzrostu [5]. Stwierdzono, że proteaza ta ma zdolność degradacji białek wiążących insulinopodobne czynniki wzrostu (IGFBPs). Uwalniając IGF-I i IGF-II z kompleksów z ich inhibitorem

wały szybszy i zaburzony wzrost (tworzenie ognisk) *in vitro*, a po dożylnym podaniu myszom wykazywały zwiększoną zdolność do tworzenia przerzutów [57].

## V. Katepsyna D jako wskaźnik rozwoju choroby nowotworowej

W ostatnich latach podjęto wiele badań poświęconych wykorzystaniu oznaczania katepsyny D do celów klinicznych w onkologii. Oznaczano zawartość

białka enzymu (metodami IRMA, RIA) w surowicy krwi i w ekstraktach otrzymywanych z guzów nowotworowych oraz lokalizację enzymu w komórkach rakowych i komórkach podścieliska guzów (metodą IHCH). Zawartość katepsyny D korelowano z zaawansowaniem procesu chorobowego i długością życia chorych po leczeniu operacyjnym. Badania miały na celu między innymi identyfikację chorych o gorszym rokowaniu w celu rozważenia zmiany leczenia lub wprowadzenia leczenia uzupełniającego. W Tabeli 2 przedstawiono wyniki badań przeprowadzonych w latach 1990-2000. W badaniach tych wykazano wzrost zawartości katepsyny D w surowicy krwi lub/i w komórkach licznych nowotworów: sutka [58-61], szyjki macicy [62], jajnika [63, 64], błony śluzowej macicy [65, 66], prostaty [67-69], mózgu [70, 71], tarczycy [72-74], krtani [75, 76], wątroby [48, 77], żołądka [78-81], jelita grubego [82-85], oskrzeli [86, 87], skóry (czerniak złośliwy) [88-90] oraz głowy i szyi (rak płaskonabłonkowy) [91-93]. Analizując czasy przeżycia chorych leczonych operacyjnie zauważono, że zwiększona zawartość katepsyny D w guzie nowotworowym jest niekorzystnym czynnikiem rokowniczym (krótszy czas życia lub krótszy czas remisji) w przypadku licznych nowotworów: sutka [59, 61], szyjki macicy [62], endometrium [65], krtani [76], oskrzeli [86, 87] i skóry (czerniak złośliwy) [89]. Zbieżności takiej nie stwierdzono w odniesieniu do chorych z nowotworami jajnika [64] i prostaty [68]. Podobne badania przeprowadzone u chorych z rakiem żołądka [80, 81] i rakiem jelita grubego [84, 85] dostarczyły niejednoznacznych wyników. Brak zbieżności pomiędzy zwiększoną zawartością katepsyny D w guzie nowotworowym a czasem przeżycia chorych w niektórych nowotworach może wynikać z wielorakich funkcji jakie pełni ten enzym. Jak podano wcześniej, katepsyna D oprócz działania mitogennego i nasilania inwazyjności nowotworów, może przyczyniać się do hamowania wzrostu nowotworów biorąc udział w procesie apoptozy, w odpowiedzi immunologicznej i w hamowaniu neoangiogenezy.

Wydaje się, że w przypadku niektórych nowotworów zawartość katepsyny D w guzach nowotworowych może być prognostykiem przeżywalności pacjentów.

*Artykuł otrzymano 19 kwietnia 2001 r.  
Zaakceptowano do druku 18 czerwca 2001 r.*

## Piśmiennictwo:

1. Rochefort H, Liaudet Coopman E (1999) *APMIS* **107**: 86-95
2. Aznavoorian S, Murphy AN, Stetler Stevenson WG, Liotta LA (1993) *Cancer* **71**: 1368-1383
3. Scott GK (1997) *Cancer J* **10**: 80-86
4. Conover CA, Perry JE, Tindall DJ (1995) *J Clin Endocrinol Metab* **80**: 987-993
5. Liaudet E, Derocq D, Rochefort H, Garcia M (1995) *Cell Growth Diff* **6**: 1045-1052
6. Fusek M, Vetvicka V (1994) *Biochem J* **303**: 775-780
7. Vetvicka V, Vetvickova J, Hilgert I, Voburka Z, Fusek M (1997) *Int J Cancer* **73**: 403-409
8. Augereau P, Garcia M, Mattei MG, Cavailles V, Depadova F, Derocq D, Capony F, Ferrara P, Rochefort H (1988) *Mol Endocrinol* **2**: 186-192
9. Redecker B, Heckendorf B, Grosch HW, Mersmann G, Hasilik A (1991) *DNA Cell Biol* **10**: 423-431
10. Cavailles V, Augereau P, Rochefort H (1993) *Proc Natl Acad Sci USA* **90**: 203-207
11. Sheikh MS, Augereau P, Chalbos D, Garcia M, Rochefort H (1996) *J Steroid Biochem Mol Biol* **57**: 283-291
12. Wang F, Duan R, Chirgwin J, Safe SH (2000) *J Mol Endocrinol* **24**: 193-202
13. Maudelonde T, Martinez P, Brouillet JP, Laffargue F, Pages A, Rochefort H (1990) *J Clin Endocrinol Metab* **70**: 115-121
14. Faust PL, Kornfeld S, Chirgwin JM (1985) *Proc Natl Acad Sci USA* **82**: 4910-4914
15. Paris A, Strukej B, Pungercar J, Renko M, Dolenc I, Turk V (1995) *FEBS Lett* **369**: 326-330
16. Lemansky P, Gieselmann V, Hasilik A, von Figura K (1984) *J Biol Chem* **259**: 10129-10135
17. Fortenberry SC, Schorey JS, Chirgwin JM (1995) *J Cell Sci* **108**: 2001-2006
18. Gieselmann V, Hasilik A, von Figura K (1985) *J Biol Chem* **260**: 3215-3220
19. Larsen LB, Boisen A, Petersen TE (1993) *FEBS Lett* **319**: 54-58
20. Gulnik S, Baldwin ET, Tarasova N, Erickson J (1992) *J Mol Biol* **227**: 265-270
21. Contractor SF, Mason RM, Oakey M (1982) *Placenta* **3**: 45-56
22. Michalak S, Ostrowska H, Skrzydlewski Z, Doroszko M, Grygoruk M (1988) *Ginekolog Pol* **59**: 284-288
23. von Clausbruch UC, Tschesche H (1988) *Biol Chem Hoppe Seyler* **369**: 683-691
24. Azaryan A, Akopyan T, Buniatian H (1983) *Biomed Biochim Acta* **42**: 1237-1246
25. Fusek M, Baudys M, Metcalf P (1992) *J Mol Biol* **226**: 555-557
26. Bever CT Jr, Morgan KD, Whitaker JN (1989) *Inflammation* **13**: 309-316
27. McKim JM Jr, Choudhuri S, Klaassen CD (1992) *Toxicol Appl Pharmacol* **116**: 117-124
28. Briozzo P, Morisset M, Capony F, Rougeot C, Rochefort H (1988) *Cancer Res* **48**: 3688-3692
29. Sapolsky AI, Altman RD, Woessner JF, Howell DS (1973) *J Clin Invest* **52**: 624-633
30. Pałka JA, Bańkowski E, Worowski K (1984-85) *Rocz Akad Med Białymst* **29-30**: 53-58
31. Nakajima M, Chop AM (1991) *Semin Cancer Biol* **2**: 115-127
32. Barrett AJ, Heath MF (1977) W: Dingle JT (red) *Lysozymes: a laboratory handbook*. Elsevier, North-Holland Biomedical Press, Amsterdam, str. Xxx-yyy
33. Erickson JW, Baldwin ET, Bhat TN, Gulnik S (1995) W: Takahasi K (red) *Aspartic proteinases: structure, function, biology and biomedical implications*. Plenum Press, New York, str. 181-192
34. Zull JE, Chuang J (1985) *J Biol Chem* **260**: 1608-1613

35. van der Stappen JW, Williams AC, Maciewicz RA, Paraskeva C (1996) *Int J Cancer* 67: 547-554
36. Wiederanders B, Kirschke H (1989) *Arch Biochem Biophys* 272: 516-521
37. Graf L, Kenessey A, Patthy A, Grynbaum A, Marks N, Lajtha A (1979) *Arch Biochem Biophys* 193: 101-109
38. Morris JB (1978) *J Clin Endocrinol Metab* 46: 153-157
39. Morikawa W, Yamamoto K, Ishikawa S, Take-moto S, Ono M, Fukushi Ji, Naito S, Nozaki C, Iwanaga S, Kuwano M (2000) *J Biol Chem* 275: 38912-38920
40. Lenarcic B, Krasovec M, Ritonja A, Olafsson I, Turk V (1991) *FEBS Lett* 280: 211-215
41. Pimenta DC, Chen VC, Chao J, Juliano MA, Ju-liano L (2000) *J Protein Chem* 19: 411-418
42. Saftig P, Hetman M, Schmahl W, Weber K, He-ine L, Mossmann H, Koster A, Hess B, Evers M, von Figura K (1995) *EMBO J* 14: 3599-3608
43. Ollinger K (2000) *Arch Biochem Biophys* 373: 346-351
44. Nagata S (1997) *Cell* 88: 355-365
45. Wu GS, Saftig P, Peters C, El Deiry WS (1998) *Oncogene* 16: 2177-2183
46. Williams KP, Smith JA (1993) *Arch Biochem Biophys* 305: 298-306
47. Gopalan P, Dufresne MJ, Warner AH (1987) *Can J Physiol Pharmacol* 65: 124-129
48. Leto G, Tumminello FM, Pizzolanti G, Montal-to G, Soresi M, Ruggeri I, Gebbia N (1996) *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 34: 555-560
49. Keyszer GM, Heer AH, Kriegsmann J, Geiler T, Trabandt A, Keysser M, Gay RE, Gay S (1995) *Ar-thritis Rheum* 38: 976-984
50. Hamazaki H (1996) *FEBS Lett* 396: 139-142
51. Capony F, Rougeot C, Montcourrier P, Cavail-les V, Salazar G, Rochefort H (1989) *Cancer Res* 49: 3904-3909
52. Maguchi S, Taniguchi N, Makita A (1988) *Cancer Res* 48: 362-367
53. Tsukuba T, Okamoto K, Yasuda Y, Morikawa W, Nakanishi H, Yamamoto K (2000) *Mol Cells Dec* 31: 601-11
54. Gołaszewski Z, Gacko M, Chyczewska E, Chy-czewski L, Myćko G, Worowski K (1997) *Rocz Akad Med Białymst* 42: 48-59
55. Briozzo P, Badet J, Capony F, Pieri I, Montcour-rier P, Barritault D, Rochefort H (1991) *Exp Cell Res* 194: 252-259
56. Humphries MJ, Ayad SR (1983) *Nature* 305: 811-813
57. Garcia M, Derocq D, Pujol P, Rochefort H (1990) *Oncogene* 5: 1809-1814
58. Brouillet JP, Dufour F, Lemamy G, Garcia M, Schlup N, Grenier J, Mani JC, Rochefort H (1997) *Cancer* 79: 2132-2136
59. Foekens JA, Look MP, Bolt de Vries J, Meijer van Gelder ME, van Putten WL, Klijn JG (1999) *Br J Cancer* 79: 300-307
60. Gonzalez Vela MC, Garijo MF, Fernandez F, Bu-elta L, Val Bernal JF (1999) *Histopathology* 34: 35-42
61. Tetu B, Brisson J, Lapointe H, Wang CS, Ber-nard P, Blanchette C Breast (1999) *Cancer Res Treat* 55: 137-147
62. Kristensen GB, Holm R, Abeler VM, Trope CG (1996) *Cancer* 78: 433-440
63. Athanassiadou P, Sakellariou V, Michalas S, Petrakakou E, Athanassiades P, Aravantinos D (1997) *Int J Gynaecol Obstet* 56: 31-37
64. Ferrandina G, Scambia G, Fagotti A, D'Agosti-no G, Benedetti Panici P, Carbone A, Mancuso S (1998) *Br J Cancer* 78: 1645-1652
65. Losch A, Kohlberger P, Gitsch G, Kaider A, Bre-itenecker G, Kainz C (1996) *Br J Cancer* 73: 1525-1528
66. Nazeer T, Malfetano JH, Rosano TG, Ross JS (1992) *Am J Clin Pathol* 97: 764-769
67. Chambon M, Rebillard X, Rochefort H, Brouil-let JP, Baldet P, Guiter J, Maudelonde T (1994) *Prostate* 24: 320-325
68. Moul JW, Maygarden SJ, Ware JL, Mohler JL, Maher PD, Schenkman NS, Ho CK (1996) *J Urol* 155: 982-985
69. Yang Y, Chisholm GD, Habib FK (1992) *Prostate* 21: 201-208
70. Sivaparvathi M, Sawaya R, Chintala SK, Go Y, Gokaslan ZL, Rao JS (1996) *Neurosci Lett* 208: 171-174
71. Robson DK, Ironside JW, Reid WA, Bogue PR (1990) *Neuropathol Appl Neurobiol* 16: 39-44
72. Kraimps JL, Metaye T, Millet C, Margerit D, In-grand P, Goujon JM, Levillain P, Babin P, Be-gon F, Barbier J (1995) *Surgery* 118: 1036-1040
73. Metaye T, Kraimps JL, Goujon JM, Fernandez B, Quellard N, Ingrand P, Barbier J, Begon F (1997) *J Clin Endocrinol Metab* 82: 3383-3388
74. Holm R, Hoie J, Kaalhus O, Nesland JM (1995) *Vir-chows Arch* 427: 289-294
75. Ferrandina G, Scambia G, Benedetti Panici P, Almadori G, Paludetti G, Cadoni G, Distefano M, Maurizi M, Mancuso S (1992) *Cancer Lett* 67: 133-138
76. Seiwerth S, Stambuk N, Konjevoda P, Masic N, Vasilj A, Bura M, Klapan I, Manojlovic S, Danic D (2000) *J Chem Inf Comput Sci* 40: 545-549
77. Tumminello FM, Leto G, Pizzolanti G, Candiloro V, Crescimanno M, Crosta L, Flandina C, Mont-alto G, Soresi M, Carroccio A, Bascone F, Ru-ggeri I, Ippolito S, Gebbia N (1996) *Anticancer Res* 16: 2315-2320
78. Russo A, Bazan V, Migliavacca M, Zanna I, Tu-biolo C, Tumminello FM, Dardanoni G, Cajozzo M, Bazan P, Modica G, Latteri M, Tomasino RM, Colucci G, Gebbia N, Leto G (2000) *Clin Cancer Res* 6: 178-184
79. Pelaez Bujan Md, Ruibal Morell A, Aza Gonza-lez J (1999) *Rev Esp Enferm Dig* 91: 826-837
80. Allgayer H, Babic R, Grutzner KU, Beyer BCM, Tarabichi A, Schildberg FW, Heiss MM (1997) *Cancer* 80: 179-187
81. Theodoropoulos GE, Lazaris AC, Panoussopou-los D, Davaris P, Golematis BC (1995) *J Surg On-col* 58: 176-183
82. Galandiuk S, Miseljic S, Yang AR, Early M, Mc-Coy MD, Wittliff JL (1993) *Arch Surg* 128: 637-642
83. Arao J, Fukui H, Ono Y, Ueda Y, Chiba T, Fu-jimori T (2000) *Dis Colon Rectum* 43: 396-401
84. Caruso ML, Valentini AM (1996) *Anticancer Res* 16: 3813-3818
85. Theodoropoulos GE, Panoussopoulos D, Laza-ris AC, Golematis BC (1997) *J Surg Oncol* 65: 242-248
86. Higashiyama M, Doi O, Kodama K, Yokouchi H, Kasugai T, Ishiguro S (1997) *J Surg Oncol* 65: 10-19
87. Sloman A, D'Amico F, Yousem SA (1996) *Arch Pa-thol Lab Med* 120: 465-472
88. Westhoff U, Fox C, Otto FJ (1998) *Anticancer Res* 18: 3785-3788
89. Otto FJ, Goldmann T, Biess B, Lippold A, Suter L, Westhoff U (1999) *Oncology* 56: 208-214
90. Bartenjev I, Rudolf Z, Stabuc B, Vrhovec I, Per-kovic T, Kansky A (2000) *Int J Dermatol* 39: 599-602
91. Strojan P, Budihna M, Smid L, Vrhovec I, Skrk J (1998) *Cancer Lett* 130: 49-56
92. Zeillinger R, Eder S, Schneeberger C, Ullricht R, Speiser P, Swoboda H (1996) *Anticancer Res* 16: 449-454
93. Gandour-Edwards R, Trock B, Donald PJ (1999) *Head Neck* 21: 718-722



# Syntazy pseudourydynowe — enzymy wprowadzające najczęstszy w kwasach nukleinowych modyfikowany nukleozyd — pseudourydynę

## Pseudouridine synthases — enzymes introducing the most abundant modified nucleoside in the nucleic acids — the pseudouridine

JOANNA PIENKOWSKA<sup>1</sup>, ZOFIA SZWEYKOWSKA-KULIŃSKA<sup>2</sup>

### Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Prokariotyczne syntazy pseudourydynowe
- III. Klasyfikacja syntaz pseudourydynowych
  - III-1. Podział syntaz na klasy z uwzględnieniem ich specyficzności substratowej
  - III-2. Podział syntaz na rodziny z uwzględnieniem charakterystycznych stałych motywów aminokwasowych w tych enzymach
- IV. Mechanizm reakcji pseudourydylacji katalizowanej przez TruA z *E. coli*
- V. Eukariotyczne syntazy pseudourydynowe
  - V-1. Grupa syntaz pseudourydynowych Pus1
  - V-2. Grupa syntaz pseudourydynowych Pus3
  - V-3. Syntazy pseudourydynowe Pus4p i Pus5p z *Saccharomyces cerevisiae*
  - V-4. Grupa syntaz pseudourydynowych współpracujących z kompleksem rRNA-snoRNA
- VI. Podsumowanie

### Contents:

- I. Introduction
- II. Prokaryotic pseudouridine synthases
- III. Classification of the pseudouridine synthases
  - III-1. Categorization of the pseudouridine synthases according to their substrate specificity
  - III-2. Categorization of the pseudouridine synthases according to conserved amino acids sequence motives
- IV. The mechanism of the isomerization of uridine in RNA catalyzed by pseudouridine synthase TruA
- V. Eukaryotic pseudouridine synthases
  - V-1. The group of Pus1 pseudouridine synthases
  - V-2. The group of Pus3 pseudouridine synthases
  - V-3. Pseudouridine synthases Pus4p and Pus5p from *Saccharomyces cerevisiae*
  - V-4. The group of pseudouridine synthases acting on the complex rRNA-snoRNA
- VI. Conclusions

**Wykaz stosowanych skrótów:** kDa — kilodaltony; PTC — centrum peptydylotransferazowe; Pus1, Pus3 — nazwy poszczególnych grup syntaz pseudourydynowych; *rlu* — nazwa genu syntazy pseudourydynowej pochodząca od angielskiego określenia „*ribosomal large subunit pseudo U formation or U modification*”; rRNA — RNA rybosomowe; *rsu* — nazwa genu syntazy pseudourydynowej pochodząca od angielskiego określenia „*ribosomal small subunit pseudo U formation or U modification*”; snoRNA — małe jąderkowe RNA; snRNA — małe jąderkowe RNA; *tru* — nazwa genu syntazy pseudourydynowej pochodząca od angielskiego określenia „*tRNA pseudo U formation or U modification*”; TruA, TruB, RsuA, RluB, RluC, RluD,

Pus4p, Pus5p, Cbf5p, Nap57, Nop60B — nazwy poszczególnych syntaz pseudourydynowych;

### I. Wstęp

Pseudourydyna (5-β-D-rybofuranozylouracyl; Ψ), izomer urydyny jest jednym z najczęściej spotykanych modyfikowanych nukleozydów w cząsteczkach RNA. Pseudourydyna obecna jest w kwasach rybonukleinowych we wszystkich trzech królestwach: Eubacteria, Archaeobacteria oraz Eukaryota. W organizmach eubakteryjnych i eukariotycznych pseudourydyna obficie występuje w transferowych RNA i w rybosomowych RNA. Obecna jest również w archebakteryjnym rybosomowym RNA [1]. W organizmach eukariotycznych pseudourydynę zidenty-

<sup>1</sup>Dr, <sup>2</sup>prof. dr hab., Zakład Ekspresji Genów UAM w Poznaniu; Międzyzgodzka 5, 60-371 Poznań

fikowano także w małych jądrowych RNA (snRNA) i małych jąderkowych RNA (snoRNA) [2, 3]. Owoce ostatnich lat badań jest odkrycie pseudourydyny w RNA wirusa żółtej mozaiki rzepy [4]. Najwyższą zawartością pseudourydyny w RNA charakteryzują się organizmy eukariotyczne. W rRNA małej podjednostki rybosomowej organizmów prokariotycznych i eukariotycznych liczba reszt  $\Psi$  jest zmienna, a ich rozmieszczenie nie pokrywa się z żadnymi znanymi miejscami o istotnym znaczeniu funkcjonalnym. Natomiast w przypadku rRNA dużej podjednostki rybosomowej (23S rRNA u prokariotów i 28S rRNA u eukariotów), chociaż liczba pseudourydyn też jest różna, to ich rozmieszczenie ogranicza się do trzech oddzielnych obszarów, które w strukturze trzeciorzędowej cząsteczki znajdują się w obrębie lub w bliskim sąsiedztwie centrum peptydylotransferazowego.

Pseudourydyna jest wprowadzana do RNA na poziomie polinukleotydu na drodze izomeryzacji urydyny. Reakcja pseudourydylacji polega na hydrolizie wiązania N-glikozydowego, obrocie pierścienia uracylu oraz jego ponownym przyłączeniu do rybozy poprzez nietypowe wiązanie węgiel-węgiel (C5-C1'). Reakcja katalizowana jest przez enzymy zwane **syntazami pseudourydynowymi** charakteryzujące się wysoką specyficznością substratową. Izomeryzacja nie wymaga nakładu energii. Dotychczas sądzono, iż nie wymaga ona również udziału żadnego kofaktora. Z ostatnich doniesień wiadomo jednak, iż w przypadku przynajmniej jednej syntazy pseudourydynowej (Pus1p) w reakcji izomeryzacji urydyny jako istotny kofaktor strukturalny udział bierze atom cynku [5].

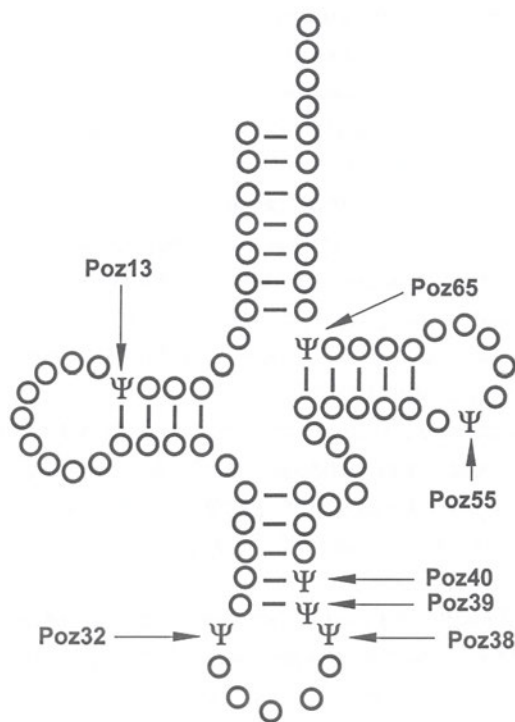
Znaczenie obecności  $\Psi$  w kwasach rybonukleinowych nie jest w pełni określone. Wiadomo jednak, iż ten modyfikowany nukleozyd stabilizuje drugorzędową strukturę regionu RNA w którym występuje, a co za tym idzie poprawia precyzję wykonywanego przez dany rodzaj RNA zadania. Stwierdzono na przykład, że obecność  $\Psi$  w pozycji 35 roślinnego tRNA<sup>Tyr</sup> wpływa na precyzyjne dekodowanie przez tę cząsteczkę mRNA. Sugeruje się również, iż wyżej opisana lokalizacja reszt pseudourydynowych w prokariotycznym 23S rRNA i eukariotycznym 28S rRNA dużej podjednostki rybosomowej może mieć istotne znaczenie dla biosyntezy białka. Z punktu widzenia znaczenia obecności aktywnej syntazy pseudourydynowej interesujące jest również powiązanie choroby genetycznej zwanej dyskeratozą z mutacjami w wysoce konserwatywnym genie kodującym dyskerynę — syntazę pseudourydynową wprowa-

dającą reszty pseudourydynowe do rybosomowych RNA u człowieka [6].

## II. Prokariotyczne syntazy pseudourydynowe

Pierwszym zbadanym enzymem należącym do rodziny enzymów modyfikujących U do  $\Psi$  jest syntaza pseudourydynowa I (**TruA**), produkt genu *hisT* (później nazwanego — *truA*), wyizolowana z dwóch organizmów: *Salmonella typhimurium* i *Escherichia coli* [7, 8]. Enzym ten modyfikuje pozycje 38, 39 i 40 w ramieniu antykodonowym cząsteczek tRNA. Stwierdzono, że w obecności substratu enzym ulega dimeryzacji.

Około 50% wszystkich rodzajów tRNA w organizmach prokariotycznych charakteryzuje się obecnością pseudourydyny w regionie ramienia antykodonowego (Ryc. 1). Wynik porównania rozmaitych se-



Ryc. 1. Występowanie pseudourydyn w cząsteczkach tRNA z *E. coli*. Strzałkami zaznaczono pozycje modyfikowane.

kwencji tRNA w tym regionie sugeruje, że TruA nie rozpoznaje specyficznej sekwencji lecz raczej jest zdolna do konwersji w pseudourydynę każdej reszty urydynowej, która byłaby w pozycji 38, 39 lub 40 w regionie antykodonowym.

Funkcja pseudourydyn wprowadzanych przez TruA nie jest w pełni poznana. Wiadomo, że tRNA pozbawione tych pseudourydyn funkcjonują prawidłowo w reakcji aminoacylacji oraz podczas syntezy białka. Z drugiej jednak strony, takie tRNA nie są zdolne do uczestniczenia w regulacji kilku operonów na poziomie transkrypcyjnym. Jako przykład



przytoczyć tu można wpływ tRNA<sup>His</sup> na proces regulacji ekspresji operonu histydynowego u *S. typhimurium*. Operon histydynowy składa się z dziesięciu genów. Jego ekspresja regulowana jest przez poziom histydyny w środowisku i polega na powstawaniu alternatywnych form mRNA, które tworzą lub nie charakterystyczną strukturę atenuatora. Informacyjny RNA, powstały w wyniku transkrypcji operonu histydynowego, zawiera sekwencję liderową, w skład której wchodzi ciąg siedmiu kodonów histydynowych. W obecności wysokiego poziomu histydyny w komórce cała maszyna translacyjna posuwa się tuż za polimerazą RNA wzdłuż odcinka liderowego operonu, tworzy się struktura atenuatorowa, powodująca przerwanie transkrypcji. Transferowy RNA<sup>His</sup> pozbawiony pseudourydyn w pozycjach 38, 39 i 40, pomimo normalnej aminoacylacji, prawdopodobnie zbyt wolno odczytuje te siedem kodonów histydynowych, co uniemożliwia atenuację powodując tym samym stałą derepresję operonu. Fakt ten sugeruje, iż brak pseudourydyn w pętli i ramieniu antykodonowym wpływa negatywnie na oddziaływanie kodon-antykodon.

Pierwotnie myślano, iż brak TruA w komórce *E. coli* ma niewielki wpływ na jej wzrost. Jednak eksperymenty wykazały, że obecność tego enzymu wymagana jest dla prawidłowego wzrostu komórki w momencie, gdy jest ona hodowana na pożywce pozbawionej uracylu [9].

Kolejnym klonowanym genem syntazy prokariotycznej jest syntaza pseudourydynowa 55 z *E. coli* (TruB) [10]. Enzym ten przeprowadza konwersję U55 do Ψ55 w pętli TΨC w większości cząsteczek tRNA (Ryc. 1).

Ponieważ niemal wszystkie rodzaje tRNA zawierają Ψ55, to przypuszcza się, że obecność pseudourydyny w tej pozycji ma istotne znaczenie dla komórki. Jednakże, dotychczas nie wykazano istnienia żadnych specyficznych funkcji zależnych od obecności Ψ55 w tRNA. Najnowsze wyniki badań polegających na delecji genu *truB* wykazały, iż jedynie białko TruB jest odpowiedzialne za wprowadzanie Ψ55 do tRNA *in vivo*, a brak tego enzymu wydaje się nie mieć wpływu na wzrost komórki bakteryjnej. Dopiero eksperyment kompetycyjny wykazał, iż w sytuacji wspólnej hodowli szczepu dzikiego ze szczepem delecyjnym dochodzi do silnej selekcji skierowanej przeciwko komórkom zmutowanym.

W bakteryjnej komórce *Escherichia coli* zidentyfikowano w sumie 10 reszt pseudourydynowych we wszystkich rRNA. W przeciwieństwie do organizmów eukariotycznych, u których w pseudourydylacji rRNA biorą udział małe jąderkowe RNA uży-

wające prawdopodobnie jednej wspólnej syntazy pseudourydynowej, wydaje się, że u *E. coli* istnieją specyficzne syntazy dla każdego modyfikowanego miejsca. Jak dotychczas, zidentyfikowano pięć genów syntaz pseudourydynowych, które odpowiedzialne są za wprowadzanie dziewięciu z dziesięciu pseudourydyn.

U *E. coli* w rRNA małej podjednostki rybosomowej znajduje się tylko jedna pseudourydyna, w pozycji 516. Wiadomo, iż obszar, w którym ona występuje, zaangażowany jest w proces rozpoznawania kodonu podczas syntezy białka. W celu określenia funkcji tej pojedynczej reszty pseudourydynowej, oczyszczono i klonowano enzym katalizujący jej tworzenie (RsuA) [11]. W badaniach *in vitro* substratem preferowanym przez enzym jest fragment RNA będący w kompleksie z rybosomowymi białkami podjednostki 30S — RNP (reszty 1 — 678). Stąd wydaje się, że powstawanie Ψ *in vivo* zachodzi na etapie pośrednim składania podjednostki 30S, a enzym RsuA rozpoznaje strukturę III-cio rzędową przyjmowaną przez substratowy RNA podczas tego procesu.

Znaczenie RsuA dla komórki *E. coli* zależy od tego jaką rolę strukturalną i/lub funkcjonalną pełni Ψ516 w rybosomie. Z jednej strony, Ψ516 znajduje się w bardzo istotnym miejscu 16S rRNA, będąc nukleotydem bliskim tzw. pętli „530”, która zaangażowana jest w proces rozpoznawania kodonu [12]. Z drugiej strony, w eksperymentach *in vitro*, podjednostki 30S pozbawione wszystkich modyfikowanych nukleozydów (m. in. Ψ516) są funkcjonalne we wszystkich etapach syntezy białka, a więc również w procesie rozpoznawania kodonu [13]. Również w eksperymentach *in vivo* nie zaobserwowano żadnego wpływu braku Ψ516 (wskutek delecji *rsuA*) na wzrost komórek [14].

Kolejnym sklonowanym genem enzymu pseudourydylującego jest gen syntazy wprowadzającej Ψ746 do 23S RNA oraz Ψ32 do tRNA<sup>Phe</sup> u *E. coli* [15]. Enzym ten (RluA), kodowany przez gen *rluA*, modyfikuje pozycję 746 ze 100% wydajnością zarówno pełnej długości 23S RNA, jak i fragment zawierający reszty 1-847. Enzym ten modyfikuje również transkrypty tRNA<sup>Phe</sup> w pozycji 32. W obu substratach, 23S RNA i tRNA<sup>Phe</sup>, pseudourydyny w pozycji 746 i 32, występują w regionach jednoniciowych w obrębie tej samej sekwencji, 5'-ΨUG-AAA-3', zlokalizowanej blisko ramienia. Z tego powodu przypuszcza się, że syntaza ta może wymagać dla rozpoznania odpowiedniej urydyny jedynie krótkiego ciągu specyficznej sekwencji nukleotydo-wej znajdującej się po 3' stronie od miejsca pseudourydylacji.



Znaczenie RluA dla *E. coli* zależy od roli jaką pełni  $\Psi$ 746 w strukturze i/lub funkcji rybosomu. Ponieważ region, w którym leży pseudourydyna znajduje się w 5'-połowie cząsteczki, która przypuszczalnie jest częścią lub co najmniej leży blisko centrum peptydylotransferazowego (PTC) rybosomu, to uważa się, iż dzięki swoim specyficznym właściwościom  $\Psi$  może pełnić pewną rolę w tworzeniu wiązania peptydowego. Zaobserwowano, że brak RluA, a w następstwie tego pseudourydyn, nie wpływa znacząco na wzrost komórki. Dopiero eksperyment kompetycyjny wykazał, iż w sytuacji wspólnej hodowli szczepu dzikiego ze szczepem delecyjnym dochodzi do silnej selekcji skierowanej przeciwko komórkom zmutowanym [16].

Kolejnym sklonowanym genem kodującym prokariotyczną syntazę pseudourydynową jest gen *rluB* z *Bacillus subtilis*. Kodowana przez ten gen syntaza (**RluB**) modyfikuje pozycję 2633 w 23S rRNA [17]. Wykazano, iż najbliższym homologiem genu *rluB* jest gen *yciL* u *E. coli*. Sugeruje to, iż gen ten koduje, odpowiadającą RluB, syntazę pseudourydynową modyfikującą pozycję 2605 w 23S rRNA u *E. coli*.

Na drodze wielokrotnego przeszukiwania genomowych baz danych pod kątem sekwencji homologicznych do genów znanych syntaz pseudourydynowych [18] zidentyfikowano kilka nowych genów potencjalnie kodujących te enzymy. Między innymi, udowodniono, że geny *rluC* i *rluD* (pierwotnie nazwane *yceC* i *yfiI*) u *E. coli* należące do rodziny RluA kodują syntazy pseudourydynowe — **RluC** i **RluD** — modyfikujące 23S rRNA [19].

Eksperymenty polegające na delecji genu *rluC* wykazały, że syntaza kodowana przez ten gen jest z całą pewnością odpowiedzialna za syntezę trzech spośród dziewięciu pseudourydyn obecnych *in vivo* w 23S rRNA u *E. coli*. Reszty urydynowe modyfikowane przez ten enzym znajdują się w pozycjach 955, 2504 oraz 2580 23S rRNA. Pomimo braku jednej trzeciej pseudourydyn, spowodowanego delecją genu *rluC*, nie zauważono żadnych zmian w tempie wzrostu komórek [20].

Natomiast syntaza pseudourydynowa RluD odpowiedzialna jest za wprowadzanie pseudourydyn w pozycje U1911, U1915 i U1917 w 23 S rRNA. Wykazano, iż brak tej syntazy w komórce powoduje silny efekt fizjologiczny objawiający się trzykrotnym spowolnieniem wzrostu komórki. Jest to pierwsze doniesienie o znacznym fizjologicznym defekcie spowodowanym delecją syntazy pseudourydynowej [21]. Pseudourydyny wprowadzane przez RluD są szczególnie interesujące, gdyż są one najbardziej konserwatywnymi pseudourydynami w RNA. Dwie

z nich,  $\Psi$ 1915 i  $\Psi$ 1917, zostały zidentyfikowane w równoważnych sobie miejscach rRNA dużej podjednostki rybosomowej w badanych organizmach będących przedstawicielami wszystkich trzech królestw: Eubacteria, Archaeobacteria i Eukaryota oraz w rRNA mitochondrialnym i chloroplastowym. Pseudourydyny te znajdują się w domenie IV 23S rRNA, która prawdopodobnie jest istotna w procesie oddziaływania z 16S rRNA i w procesie dekodowania mRNA.

### III. Klasyfikacja syntaz pseudourydynowych

#### III-1. Podział syntaz na klasy z uwzględnieniem ich specyficzności substratowej

Z analizy poznanych dotychczas syntaz pseudourydynowych wynika, że specyficzność każdej syntazy jest inna, począwszy od syntazy modyfikującej tylko jedno miejsce w jednym rodzaju RNA, poprzez syntazę modyfikującą wiele miejsc w jednej klasie RNA lub nawet enzym modyfikujący różne miejsca w różnych rodzajach RNA. W celu uporządkowania tych oraz ciągle odkrywanych syntaz podzielono je na cztery klasy specyficzności (Tabela 1) [22]. Do klasy I specyficzności należą syntazy rozpoznające tylko jedno specyficzne miejsce w jednym rodzaju RNA (np. RsuA, RluA oraz TruB i jego drożdżowy homolog Pus4p). Klasa II zawiera te syntazy, które modyfikują każdą resztę U w obrębie odcinka o stałej sekwencji nukleotydowej długości 5-6 nukleotydów ale tylko w jednym rodzaju RNA (np. TruA i jego drożdżowy homolog Pus3p oraz RluD). W klasie III znajdują się syntazy, które rozpoznają ogólną strukturę przestrzenną RNA i modyfikują miejsca bardzo od siebie odległe choć nadal znajdujące się w tym samym rodzaju RNA (np. RluC). Klasa IV jest zarezerwowana dla tych syntaz, które rozpoznają pojedyncze miejsca w więcej niż jednej klasie RNA, cechę tę nazywa się „podwójną specyficznością” lub „specyficznością wielomiejscową“ (np. RluA i Pus1p).

#### III-2. Podział syntaz na rodziny z uwzględnieniem charakterystycznych stałych motywów aminokwasowych w tych enzymach

W roku 1996 Eugene V. Koonin oraz Daniel Santi, używając kombinacji kilku metod do analizy porównawczej sekwencji aminokwasowych oraz motywów białkowych, równolegle wykazali, że cztery pierwsze scharakteryzowane syntazy pseudourydynowe, kodowane przez geny *truA*, *truB*, *rsuA* i *rluA*, charakteryzujące się różną specyficznością

Tabela 1

Obecnie znane eubakteryjne syntazy pseudourydynowe

Nazwa	Lokalizacja genu	RNA substrat	Modyfikowana pozycja	Klasa specyficzności	Masa monomeru kDa	Liczba aminokwasów
RsuA (E. c.)	49.12 min	16S rRNA	516	I	25.9	231
RluB (B. s.) (YpuL)	206.80°	23S rRNA	2605	I	26.0	229
TruB (E. c.)	71.36 min	tRNA	55	I	35.1	314
Pus4p (S. c.)		tRNA	55	I	45.3	403
Pus5p (S. c.)		mito. 21S rRNA	2819	I	Brak danych	Brak danych
TruA (E. c.)	52.46 min	tRNA	38-40	II	30.4	270
RluD (E. c.)	58.93 min	23S rRNA	1911 1915 1917	II	37.1	326
Pus3p (S. c.)		tRNA	38, 39	II	50.9	442
mPus3p (mysz)		tRNA	38, 39	II	55.5	481
RluC (E. c.) (YceC)	24.66 min	23S rRNA	955 2504 2580	III	36.0	319
spPus1p (S.p.)		tRNA	27, 28 34, 35, 36	III	Brak danych	Brak danych
mPus1p (mysz)		tRNA	27, 28 32 34, 36 67	III	46	393
RluA (E. c.)	1.30 min	23S rRNA tRNA	746 32	IV	24.9	219
Pus1p (S. c.)		tRNA U2 snRNA	27, 28 34, 36 65 67 44	IV	62.1	544

substratową, należą do czterech różnych rodzin białek, przy czym ich sekwencji nie łączy żadne znaczące statystycznie podobieństwo [23, 18]. Dalsze obserwacje wykazały, że wszystkie cztery rodziny zawierają w obrębie swojej sekwencji białkowej krótki motyw konserwatywny, tzw. Motyw II (Ryc. 2). Trzy z tych rodzin zawierają także inny motyw (Motyw I) (Ryc. 2). Na podstawie jego obecności w tej grupie białek, połączono te trzy rodziny w tzw. „nadrodzinę”. Jeden z wyżej wymienionych motywów (Motyw II) został zidentyfikowany również w dwóch innych rodzinach enzymów, które specyficznie wiążą urydynę, mianowicie w deaminazach cytydynowych (Dcd) oraz trifosfatazach urydynowych (Dut). Można więc przypuszczać, iż motyw

ten jest podstawową częścią miejsca wiążącego urydynę. Wreszcie zidentyfikowano także motyw trzeci (Motyw III) (Ryc. 2) obecny jedynie u przedstawicieli rodziny RluA i RsuA, co wskazywać może na ich bliskie pokrewieństwo.

Komputerowe analizy wykazały, że sekwencje białkowe w obrębie każdej z czterech rodzin syntaz pseudourydynowych są wysoce konserwatywne (co sugerowałoby pochodzenie każdej rodziny od wspólnego przodka) ale podobieństwo pomiędzy rodzinami jest ograniczone jedynie do krótkich motywów lub, w przypadku rodziny TruA, jest prawie niewykrywalne. Można to zinterpretować jako wskazówkę, że wspólna reakcja katalizowana przez te enzymy, mianowicie izomeryzacja urydyny, wymaga tyl-

ko zachowania bardzo ograniczonego fragmentu sekwencji wokół reszt katalitycznych, podczas gdy różnica sekwencji aminokwasowych w pozostałych regionach białek jest podyktowana rozpoznawaniem różnych elementów strukturalnych w RNA.

Porównanie 111 sekwencji Motywu II z członków „nadrodziny” (TruB, RsuA i RluA) oraz enzymów Dcd i Dut pozwoliło zidentyfikować w obrębie tego motywu resztę kwasu asparaginowego (RsuA D102) i glicynę, pięć reszt dalej za kwasem asparaginowym, jako niezmiennie (DXXXXG, gdzie X stanowi

dowolny aminokwas). Specyficzne reszty w innych pozycjach są typowe dla każdej z trzech rodzin syntaz i ich podrodzin (Ryc. 2).

Porównanie dostępnych sekwencji białek należących do rodziny TruA pozwoliło na ustalenie sześciu motywów konserwatywnych, charakterystycznych tylko dla tej rodziny, z których jedynie Blok II wykazuje znaczne podobieństwo do Motywu II obecnego u przedstawicieli nadrodziny syntaz pseudourydynowych (Ryc. 2) [24, 14].

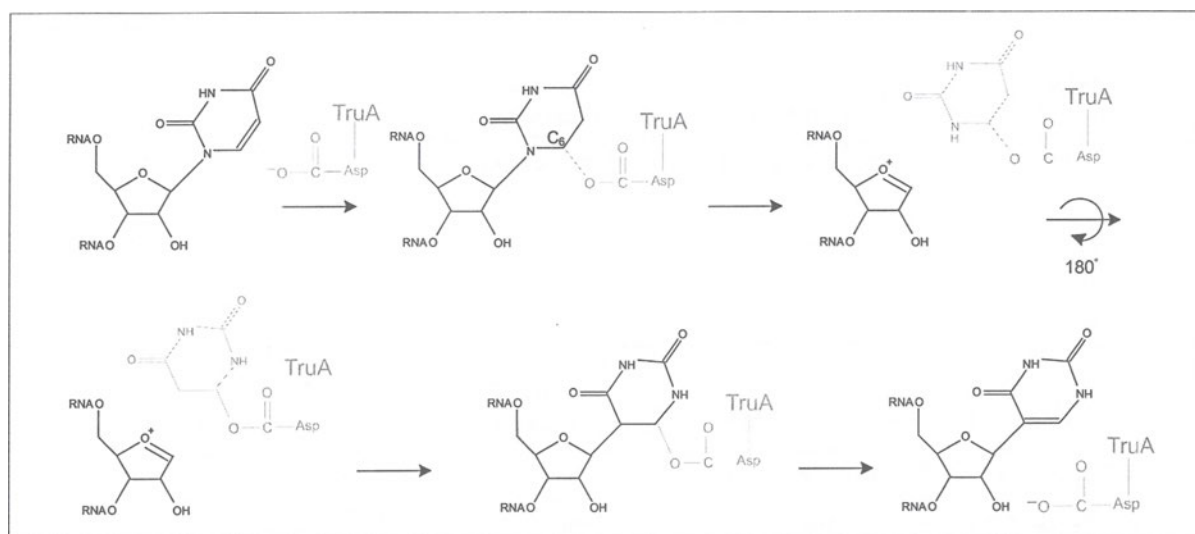
<b>A</b>			
	Motyw I	Motyw II	Motyw III
Sekwencja stała	UUUU.KP.GUU...	U.RLD..T\$GUUUU	U.U...GR..QUR..U..UG..U
Str. II-rzędowa	eeeeellllleeeel	eeeeellllleeee	eeeeellllhhhhhhhhhhhhllll
<b>RLUA-ECOLI</b>	22 IMVVKPSGLSVP	23 VHRDLMATSGVIV	78 VVLKPITGRSHQLRVHMLALGHPI 44
YCEC-ECOLI	101 ILVNLKPSGTAVHG	24 VHRDRDTSGVLLV	78 VRCSPTGRTHQIRVHTQYAGHPi 64
RIB2/YEAST	169 ILVIDKPSIPVHP	23 CNRLDKPTSGLMFL	80 VKCKPLTGRTHQIRVHLQYLGFPi 271
Str. II-rzędowa	eeeeellllleeeel	lleeellllleeee	eeeeellllhhhhhhhhhhhhhhhh
<b>RSUA-ECOLI</b>	61 YFMLNKPQGYVCS	22 AGRLDIDTTGLVLM	62 VRLTISEGRYHQVKRMFAAVGNHV 34
YCIL-ECOLI	68 VLAYKPEGELCTR	23 VGRLDVNTCGLLLF	64 YNVTLTGRNRREVRRLWEAVGVQV 36
YPUL-BACSU	61 YFLLYKPRGVISAA	22 IGRLDYDTSGLLLL	IQLTITHEGRNRQVRMFEAIGHEV 28
Str. II-rzędowa	eeeeellllllhhhh	llllllllllleeee	
<b>TRUB-ECOLI</b>	13 VLLLDKPMQSSND	17 TGALDPLATGMLPI	258
YNL480/YEAST	3 IFAIEKPSGITSNQ	53 GGTLDPLASGVLVI	329
CBF-YEAST	91 VINLDKPSNPSSHE	14 SGTLDPKVTGCLIV	380
NAP57-RAT	60 FINLDKPSNPSSHE	17 SGTLDPKVTGCLLV	332
<b>B</b>			
	Blok I	Blok II	Blok III
<b>TRUA-ECOLI</b>	17 YDGSKYWGQRQ	27 GRTDAGVHGTGQ	34 VPDD-FHARFSATARRYRYi 32
Pus3-YEAST	99 YLGWNYNGLAVQ	36 GRTDKGVSAMNQ	46 rpppnFDARFSCVHRHYKYIf 16
YQN3-CAEEL	37 YLGWEHDGLVQQ	32 GRTDKGVSFAFKQ	58 VAQT-FNARFDCNRRTYKYSf 16
Sekwencja stała	Y.G..U.GU..Q	GRTD.GVHA..Q	V....FH.RF....R.Y.Y.U
Pus1p-YEAST	99 IESALFKAFVEA	19 ARTDKGVHAGGN	31 Vnka-FDCRKMCSRWYEYL1 112
Pus2p-YEAST	21 IEGEILTKLFDV	19 ARTDKGVHAMLN	32 VNkk-FNARSACDSRWYQYL1 94
	Blok IV	Blok V	Blok VI
<b>TRUA-ECOLI</b>	LLGENDFTSF	31 ANAFVHHMVRNIVGSL	28 AKAEGLYLvavdy 18
Pus3-YEAST	FVGERDFRNF	34 GSAFLWHQVRCMMAIL	30 ANDIPLLLYdckf 98
YQN3-CAEEL	LVGEHDFSNF	43 GSGFLWHMIRYIVTIL	30 ASDTPLCLfdcgY 104
Sekwencja stała	UUG..DF..F	G.GFLU.MVR.UU..L	A...GL.L...U
Pus1p-YEAST	YLGAHNFHNF	39 GQSFMLHQIRKMVSMA	26 APALGLLLEAPVF 138
Pus2p-YEAST	YVGTHNFHNF	33 GQSFMLHQIRRMVALA	27 APAQGLLEGPVF 68

**Ryc. 2.** Konserwatywne motywy w tzw. „nadrodzynie” syntaz pseudourydynowych, w skład której wchodzi rodzina TruB, RluA i RsuA (A). Pogrubioną czcionką zaznaczono syntazy od których nazwano poszczególne rodziny. Odległości między blokami oraz odległości od N-końca białka są oznaczone cyframi. Linia „stała” pokazuje reszty aminokwasowe, które są konserwatywne w większości sekwencji tak w rodzinie RluA jak i RsuA; U oznacza duże reszty hydrofobowe (I, L, U, M, F, Y, W), \$ oznacza S lub T. Reszty kwasu asparaginowego biorące bezpośredni udział w katalizie zaznaczono gwiazdką. Z dokładnością około 72% pokazano strukturę drugorzędową: e oznacza strukturę  $\beta$  harmonijki, h oznacza helisę  $\alpha$  i l oznacza pętlę. Objasnienia do skróconych nazw organizmów: ECOLI, *E. coli*; BACSU, *Bacillus subtilis*; RAT; *Rattus norvegicus*. Konserwatywne motywy w rodzinie białek TruA (B). Sekwencje domniemanych syntaz pseudourydynowych porównano z syntazą TruA z *E. coli* oraz Pus3p z *Saccharomyces cerevisiae*. Oddzielnie, na dole wykazu, umieszczono drożdżowe syntetazy Pus1p i Pus2p należące również do rodziny TruA. Odległości między blokami oraz odległości od N-końca białka są oznaczone cyframi. Linia „stała” pokazuje reszty aminokwasowe, które są konserwatywne w większości sekwencji w rodzinie TruA. Niezmienną resztę kwasu asparaginowego biorącą udział w katalizie zaznaczono gwiazdką. Objasnienia do skróconych nazw organizmów: CAEEL, *Caenorhabditis elegans*; YEAST, *Saccharomyces cerevisiae*.



#### IV. Mechanizm reakcji pseudourydylacji katalizowanej przez TruA z *E. coli*

Przez szereg lat nie był znany mechanizm reakcji pseudourydylacji. Dopiero dwa lata temu, w eleganckich doświadczeniach grupa D. Santiago zaproponowała następujący mechanizm działania jednej z syntaz — TruA, w który zaangażowany jest kowalencyjny kompleks tworzony między kwasem asparaginowym obecnym w pozycji 60 enzymu (Motyw II) a mającym ulec pseudourydylacji UMP 39 w tRNA<sup>Phe</sup>. W mechanizmie tym konserwatywna reszta kwasu asparaginowego w pozycji 60 (Asp60) służy jako nukleofil atakując węgiel w pozycji 6 docelowej reszty uracylu i odłącza zasadę od łańcucha RNA. Po obrocie pierścienia uracylu kwas asparaginowy odłącza się od zasady pozwalając tym samym na ponowne przyłączenie się jej do pierścienia rybozy (Ryc. 3).



Ryc. 3. Mechanizm reakcji pseudourydylacji. Reszta kwasu asparaginowego stanowi katalityczny nukleofil odłączający uracyl od łańcucha RNA.

Wyniki badań wskazują, iż w syntazach pseudourydynowych kwas asparaginowy „wiąząc specyficznie” substratowy tRNA umiejscawia precyzyjnie mającą ulec pseudourydylacji urydynę w miejscu aktywnym enzymu [25, 27, 14].

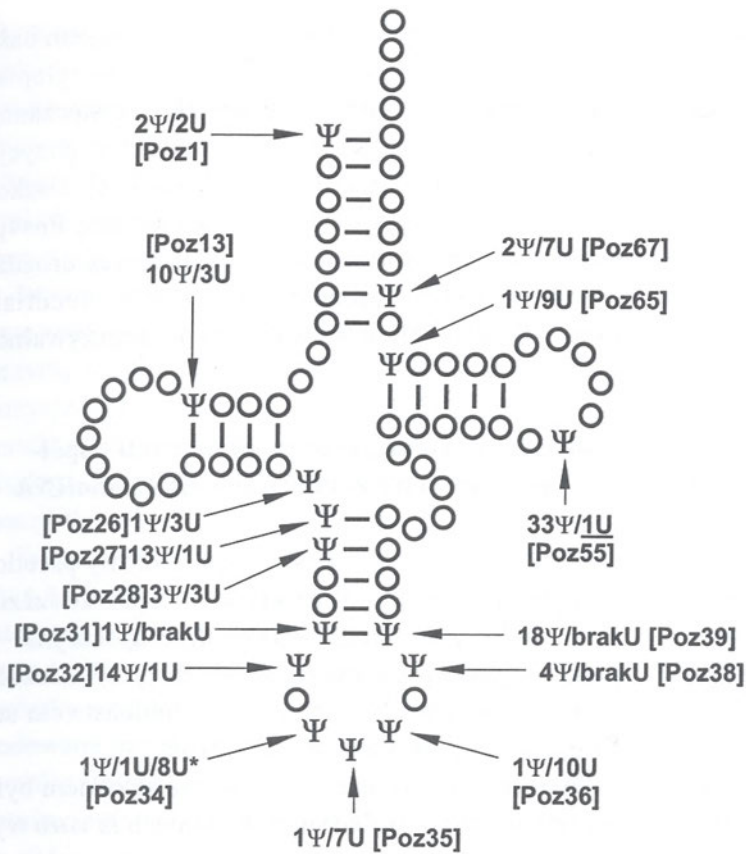
Badania pozwoliły ustalić strukturę przestrzenną TruA z *E. coli* oraz potwierdzić katalityczną funkcję reszty kwasu asparaginowego [28]: TruA jest białkiem dimerycznym, które posiada na swojej powierzchni dwa pozytywnie naładowane wgłębienia wiążące RNA. Każde wgłębienie zawiera w swoim centrum wysoce konserwatywny kwas asparaginowy. Zakłada się, iż do przeprowadzenia izomeryzacji niezbędne jest całkowite wypełnienie wgłębienia, w którym jest miejsce aktywne, przez całą cząsteczkę tRNA razem z pętlami D i T. Minisubstrat zawie-

rający pozycję 39 tRNA jest już przestrzennie niewystarczający do przeprowadzenia reakcji. Stąd wydaje się, że dimer TruA musi rozpoznawać specyficzny kształt i ładunek całej cząsteczki tRNA, a nie tylko trzon i pętlę antykodonową, w celu katalizy reakcji pseudourydylacji [28].

#### V. Eukariotyczne syntazy pseudourydynowe

Najlepiej zbadanymi dotychczas eukariotycznymi syntazami pseudourydynowymi są enzymy wyizolowane z *Saccharomyces cerevisiae*. W różnych drożdżowych cząsteczkach tRNA reszty pseudourydynowe zidentyfikowano w 15 odmiennych miejscach (Ryc. 4). Za pseudourydylację tych tRNA odpowiedzialnych jest co najmniej pięć lub sześć różnych enzymów. Scharakteryzowano dotychczas trzy z nich: Pus1p, Pus3p i Pus4p. Drożdżowe 18S i 25S rRNA zawierają odpowiednio 13 i 30 reszt Ψ. W organi-

zmach eukariotycznych współistnieją dwa różne systemy enzymatyczne przeprowadzające pseudourydylację. Jeden to miejscowo i regionalnie specyficzne syntazy, które działają na cząsteczki tRNA i sn-RNA, drugi to niedawno odkryty mechanizm pseudourydylacji eukariotycznego rRNA zależny od małych jąderkowych RNA (snoRNA). Wiedza o drugim z wymienionych systemów pomogła zidentyfikować homologi prokariotycznej syntazy TruB, enzymy Cbf5p (u drożdży), Nop60B (u muszek owocowych), Nap57 i dyskerynę (u wyższych eukariontów) jako te, które działają na kompleks rRNA-snoRNA [29, 30, 31]. W ostatnim czasie zidentyfikowano również syntazę pseudourydynową oznaczoną jako Pus5p, która wprowadza pseudourydynę w pozycję U2819 do mitochondrialnego 21S rRNA u dro-



Ryc. 4. Analiza statystyczna częstości występowania pseudourydyny w 34 zsekwencjonowanych do roku 1998 cząsteczkach drożdżowych cytoplazmatycznych tRNA. Obecność  $\Psi$  w sekwencji oznacza miejsce modyfikacji. Oznaczono liczbę pseudourydyn ( $\Psi$ ), niemodyfikowanych urydyn (U) i różnych modyfikowanych urydyn ( $U^*$ ) w poszczególnych pozycjach. Podkreślona litra U oznacza rzadki wyjątek od reguły: dla pozycji 55 u drożdży i dotyczy inicjatorowego tRNA<sup>Met</sup>. Dla porównania w komórce *E. coli* modyfikowane do pseudourydyny są tylko pozycje 13, 32, 38, 39, 40, 55 i 65.

żdży [32]. Wykazano eksperymentalnie, że wprowadzanie  $\Psi$  do snRNA u drożdży jest niezależne od systemu Cbf5p-snoRNA.

W wyniku analiz porównawczych syntaz eukariotycznych ze znanymi rodzinami syntaz prokariotycznych wykazano, że enzymy Pus1p, Pus2p i Pus3p są członkami rodziny TruA [33,24], Pus4p i Cbf5p należą do rodziny TruB [23], a Pus5p i kilka białek z rodziny Rib2 do rodziny RluA [23, 32].

### V-1. Grupa syntaz pseudourydynowych Pus1

Dotychczas sklonowano geny trzech syntaz pseudourydynowych typu Pus1. Uzyskano je z następujących organizmów: *Saccharomyces cerevisiae*, myszy oraz *Schistosaccharomyces pombe*. Najlepiej dotychczas zbadaną eukariotyczną syntazą pseudourydynową jest enzym o nazwie **Pus1p** z *S. cerevisiae* pseudourydylujący osiem odmiennych miejsc w różnych tRNA oraz jedno miejsce w U2 snRNA [34, 35]. Wykazano, że syntaza Pus1p wprowadza w sposób introno-zależny  $\Psi_{34}$  i  $\Psi_{36}$  do pętli antykodonowej minorowego tRNA<sup>Ile</sup> *in vitro* [36, 33]. Następnie zademonstrowano, że drożdżowa syntaza pseudourydynowa Pus1p katalizuje również *in vitro* tworzenie pseudourydyny w pozycjach 27 i/lub 28 w kilku drożdżowych tRNA cytoplazmatycznych oraz w pozycji 35 w tRNA<sup>Tyr</sup>(GUA) zawierającym intron. Tak więc, Pus1p nie tylko wykazuje szeroką specyficzność w kierunku substratów RNA ale jest również

zdolna do katalizowania reakcji izomeryzacji w różnych, niepodobnych do siebie miejscach w obrębie tej samej cząsteczki tRNA. Interesujące jest, iż szczep drożdżowy z uszkodzonym genem kodującym syntazę Pus1p charakteryzuje się obecnością  $\Psi_{35}$  w tRNA<sup>Tyr</sup>, co świadczy o istnieniu u drożdży innej syntazy, której specyficzność nakłada się na specyficzność *in vitro* Pus1p w stosunku do pozycji 35 tRNA<sup>Tyr</sup> [34]. Badania obecności  $\Psi$  w różnych tRNA pochodzących ze szczepu drożdży z uszkodzonym genem *PUS1* sugerują, że dodatkowo Pus1p odpowiedzialna jest za wprowadzanie  $\Psi$  w pozycje U<sub>26</sub>, U<sub>65</sub> i U<sub>67</sub> *in vivo* [34]. Pus1p katalizuje również izomeryzację U<sub>44</sub> w U2 snRNA [35], co wskazuje na podwójną specyficzność substratową enzymu.

Pomimo, iż Pus1p odpowiedzialna jest za wprowadzanie tak dużej liczby pseudourydyn, to uszkodzenie genu kodującego tę syntazę nie wywołuje żadnego efektu fenotypowego. Jeżeli jednak, w eksperymentach typu „*synthetic lethal*“ razem z uszkodzeniem genu *PUS1* wprowadzi się mutację do genu *LOS1*, to dochodzi do spowolnienia wzrostu komórki w 30°C oraz całkowitego jego zahamowania przy 37°C [37]. Wyniki eksperymentów z przed dwóch lat sugerują, że białko Los1p należy do rodziny importyn  $\beta$  i funkcjonuje jako receptor dla tRNA w procesie eksportu z jądra do cytoplazmy (tRNA-eksportyna). Ścisłe powiązanie genetyczne pomiędzy Pus1p a Los1p można wyjaśnić jeżeli przyjmie się, że pseudourydylacje katalizowane przez Pus1p są wymaga-



ne do tworzenia zdolnego do transportu tRNA, który następnie może być rozpoznawany przez Los1p oraz inne elementy należące do systemu transportującego tRNA z jądra. Model ten podtrzymuje fakt, że prawie wszystkie pseudouridydy wprowadzane przez Pus1p znajdują się w pozycjach, które są specyficzne dla komórki eukariotycznej oraz fakt, iż Pus1p zlokalizowana jest w jądrze. Stąd prawdopodobnym wydaje się, że syntaza Pus1p odgrywa rolę w procesie biogenezy tRNA u Eukaryota, a mianowicie w eksporcie tRNA z jądra.

Do grupy syntaz Pus1 należą również niedawno odkryte syntazy **mPus1p** z myszy [38] oraz **spPus1p** z *S. pombe* [39].

Enzymy należące do grupy Pus1 spokrewnione są pod kątem sekwencji aminokwasowej z rodziną TruA, natomiast pod kątem specyficzności substratowej różnią się od enzymów należących do tej rodziny. Grupa enzymów Pus1 różni się od rodziny TruA nie tylko specyficznością substratową ale także faktem, iż wszyscy przedstawiciele Pus1 należą wyłącznie do jednego królestwa — Eukaryota. Brak przedstawicieli Pus1 w organizmach prokariotycznych sugeruje, iż enzymy te wymagane są najprawdopodobniej do specyficznego dla organizmów eukariotycznych etapu biogenezy tRNA — eksportu z jądra komórkowego do cytoplazmy.

## V-2. Grupa syntaz pseudourydynowych Pus3

Znane są dwie przedstawicielki tej grupy: syntaza **Pus3p** z *Saccharomyces cerevisiae* [24] oraz syntaza **mPus3p** z myszy [40]. Syntaza pseudourydynowa Pus3p pierwotnie nazywana była Deg1, ponieważ uszkodzenie jej genu powodowało hamowanie wzrostu komórki drożdżowej (ang. *depressed growth*) zwłaszcza w podwyższonej temperaturze (37°C). Wykazano, iż podobnie jak TruA, Pus3p modyfikuje pozycje 38 i 39 w tRNA. Pus3p nie pseudourydyluje natomiast urydyny w pozycji 40 [24].

Wykazano, iż Pus3p nie jest genetycznie powiązana z Pus1p lub Los1p. Ponieważ funkcjonalne oddziaływanie w obrębie białkowego kompleksu pora jądrowego wydaje się być specyficzne dla Pus1p, a nie zachodzi w przypadku Pus3p, to sądzi się, że modyfikacje tylko niektórych pozycji są istotne dla procesu transportu tRNA.

## V-3. Syntazy pseudourydynowe Pus4p i Pus5p z *Saccharomyces cerevisiae*

Następnymi scharakteryzowanymi eukariotycznymi syntazami pseudourydynowymi są drożdżowe

syntazy Pus4p i Pus5p. **Pus4p** jest homologiem bakteryjnej syntazy TruB i modyfikuje U55 w cytoplazmatycznych i mitochondrialnych cząsteczkach tRNA [41]. Natomiast **Pus5p** modyfikuje pozycję 2819 w mitochondrialnym 21S rRNA [32]. Uszkodzenie genu YNL292w kodującego syntazę Pus4p, nie ma żadnego wpływu na wzrost komórek drożdżowych. Również obecność  $\Psi_{2819}$  w mitochondrialnym 21S rRNA nie jest niezbędna dla przeżywalności komórki.

## V-4. Grupa syntaz pseudourydynowych współpracujących z kompleksem rRNA-snoRNA

Do grupy tej należą następujące enzymy pseudourydylujące: Cbf5p z *S. cerevisiae*, Nap57 ze szczura, Nop60B z *D. Melanogaster* oraz dyskeryna — ludzka syntaza pseudourydynowa. Enzymy należące do tej grupy charakteryzują się podobieństwem sekwencji do bakteryjnej syntazy TruB.

Pierwszym opisanym w tej grupie enzymem była drożdżowa syntaza **Cbf5p**. W badaniach *in vitro* wykazano, że białko to wiąże się do drożdżowych centromerów i mikrotubuli [42]. Białko to jest istotne dla życia komórki, gdyż uszkodzenie genu kodującego Cbf5p powoduje zatrzymanie podziału komórkowego w fazie G<sub>1</sub>/S. Dzielące się komórki drożdżowe zawierające skrócony gen *CBF5* są opóźnione w replikacji genomu w fazie G<sub>2</sub>/M cyklu komórkowego.

Eksperymenty polegające na usunięciu z komórki genu *CBF5* wykazały, że brak białka Cbf5p silnie hamuje syntezę pseudourydyn w pre-rRNA, czego następstwem jest akumulacja w komórce niemodyfikowanego rRNA. Wykazano również, że brak Cbf5p pociąga za sobą brak wszystkich rodzajów cząsteczek snoRNA typu H/ACA (Cbf5p będąc w kompleksie z H/ACA snoRNA stabilizuje je.) W celu udowodnienia znaczącej roli Cbf5p w biosyntezie rRNA przeprowadzono mutagenezę ukierunkowaną — wprowadzono różne substytucje alaninowe do domeny katalitycznej w białku Cbf5p [43]. Szczepy drożdżowe, w których dochodziło do ekspresji w ten sposób zmienionych genów przeżywają w temperaturze 25°C ale wykazują wyraźne fenotypy wzrostu wrażliwe na ciepło i zimno. Większość mutantów zawiera obniżony poziom  $\Psi$  w warunkach temperatur ekstremalnych. Wydaje się, że rRNA pozbawione modyfikacji  $\Psi$  są niestabilne *in vivo*. Przyczyną tego stanu może być na przykład udział pseudourydyn w stabilizacji drugorzędowej struktury rRNA ułatwiającej oddziaływanie rRNA z białkami rybosomowymi podczas składania rybosomu. Wyniki



eksperymentów sugerują, że funkcjonalna domena katalityczna białek Cbf5p jest istotna dla tych oddziaływań [43]. Ostatecznie uznano, że Cbf5p jest syntazą pseudourydynową i jest integralnym składnikiem kompleksów snoRNP klasy H/ACA, których funkcja polega na dostarczeniu enzymu do miejsc jego działania.

Istnieje znacząca homologia sekwencji aminokwasowej pomiędzy Cbf5p a Pus4p (rodzina TruB), enzymy te modyfikują jednak całkowicie odmienne pozycje w RNA. Wydaje się, że Pus4p i Cbf5p powstały u pierwszych organizmów eukariotycznych w drodze duplikacji genu, a następnie uległy dywergencji funkcji.

W wyniku analizy genomu przedstawicieli królestwa Archaeobacteria zidentyfikowano otwartą ramkę odczytu, której sekwencja w 62% podobna jest do genu syntazy pseudourydynowej Cbf5p z drożdży. W związku z tym jest wysoce prawdopodobne, iż białko kodowane przez tę ramkę odczytu jest homologiem drożdżowej syntazy Cbf5p [44]. Stąd nasuwa się hipoteza, iż wprowadzanie reszt  $\Psi$  do archeobakteryjnego rRNA może być zależne od homologów eukariotycznych kompleksów H/ACA snoRNP, których ewolucyjne pochodzenie być może poprzedzało rozdział na królestwa *Archaea* i *Eucarya*.

W drodze koimmunoprecypitacji z białkiem Nopp140 wyizolowano szczurzy homolog drożdżowego Cbf5p — **Nap57** [45]. Ponieważ białko Nopp140 uczestniczy w transporcie pomiędzy jądrem i cytoplazmą, stąd wydaje się, że także Nap57 pełni pewną rolę w tym transporcie. Wewnątrzjądrowa lokalizacja Nap57 może wskazywać na jego rolę w składaniu rybosomu lub prawdopodobnie w transporcie czynnika (-ów) niezbędnych do tego składania.

Wysoki stopień zachowawczości sekwencji w grupie białek Cbf5p-Nap57 [45] sugeruje, że białka te pełnią rolę strukturalną. W zasadzie, białka strukturalne takie jak tubulina, aktyna oraz białka rybosomowe wykazują wysokie poziomy zachowawczości sekwencji. Istnieje jednak hipoteza, że Cbf5p jest białkiem wielofunkcyjnym i pełni rolę tak w funkcjonowaniu centromerów jak i w biogenezie rybosomów. Przypuszczenia te podtrzymują obserwacje, że funkcja Cbf5p i/lub jego lokalizacja (asocjacja z centromerami i jądrem) zmieniają się zależnie od fazy cyklu komórkowego.

Zidentyfikowano również odpowiednik białka Cbf5p/Nap57 u muszki owocowej — białko to nazwano — **Nop60B** [30]. Odkrycie tego białka u muszki owocowej umożliwiło zbadanie funkcji kodującego je genu. W tym celu uzyskano osobniki

*Drosophila melanogaster* ze zmutowanym *Nop60B* i wykazano, że w stanie homozygotycznym są one letalne. Wykazano, że gen muszki może zastąpić funkcjonalnie gen *Cbf5* u drożdży, co może stanowić dowód, że funkcja tego białka pozostała konserwatywna od drożdży do muszki owocowej. Interesujące natomiast jest, że szczurzy gen białka Nap57 nie komplementuje braku *Cbf5* u drożdży, pomimo iż najbardziej konserwatywny region 380 — aminokwasowy u drożdży jest bardziej zbliżony do białka szczura niż muszki. Jednakże, pomijając ten konserwatywny region, wszystkie trzy białka różnią się. Białka drożdżowe i musze rozciągają się jeszcze na długość 90 aminokwasów za regionem konserwatywnym, podczas gdy białko szczurze ma po tej stronie regionu jedynie 48 aminokwasów. Chociaż białko z *Drosophila* nie posiada na C-końcu 10 powtórzeń KKE/KKD obecnych w Cbf5p, to zawiera dużą liczbę reszt obdarzonych ładunkiem. Te różnice w C-końcach mogą decydować o tym; dlaczego tylko białko muchy może funkcjonować u drożdży.

Jednym z interesujących przykładów znaczenia syntaz pseudourydynowych może być występująca u ludzi choroba zwana dyskeratozą. Młodzi mężczyźni cierpiący na tę chorobę mają owrzodzoną skórę, słabe zęby, rzadkie włosy (łącznie z brakiem brwi) i szybko tracą paznokcie. Mężczyźni ci mają również predyspozycje do rozwoju nowotworów przewodu pokarmowego oraz mają nieprawidłowo funkcjonujący szpik kości [46]. Gen odpowiedzialny za dyskeratozę został ostatnio zidentyfikowany. Koduje on białko nazwane **dyskeryną**, które zawiera sekwencję lokalizacji jądrowej (NLS) oraz dwa ciągi aminokwasów wysoce podobne do fragmentów syntazy TruB z *E. coli* [6].

Na podstawie wysokiej homologii dyskeryny do białka szczurzego Nap57 i drożdżowego Cbf5p oraz obecności dwóch motywów charakterystycznych dla białek należących do rodziny TruB uznano, iż dyskeryna jest również syntazą pseudourydynową i pełni funkcje analogiczne do tych wykonywanych przez białka Nap57 i Cbf5p.

Ostatnie badania wykazują, iż dyskeryna jest w komórce zasocjowana z telomerazą — enzymem syntetyzującym telomery na końcach chromosomów. Linie komórkowe z uszkodzoną dyskeryną charakteryzują się obniżonym poziomem aktywności telomerażowej, ale biogeneza rRNA zachodzi w nich na normalnym poziomie [47]. Tak więc uważa się, że bezpośrednią przyczyną powstawania fenotypu choroby zwanej dyskeratozą nie jest wadliwe dojrzewanie cząsteczek rRNA, ale raczej brak aktywności te-

limerazowej, w wyniku czego, w dotkniętych chorobą tkankach chromosomy stają się niestabilne.

## VI. Podsumowanie

Wydaje się, że im wyższą pozycję zajmuje organizm w hierarchii ewolucyjnej, tym mniejszej liczby syntaz pseudourydynowych używa do pseudourydylacji swojego RNA. Zwłaszcza w przypadku organizmów eukariotycznych warto zwrócić uwagę na sposób w jaki ograniczana jest liczba enzymów wymaganych do przeprowadzenia tych potranskrypcyjnych modyfikacji. Wydaje się, że komórka używa dwóch głównych strategii w celu zminimalizowania liczby wymaganych enzymów: (1) zaangażowanie cząsteczek RNA „naprowadzających“ (ang. *guide RNA*) nadających różną specyficzność unikalnej maszyny enzymatycznej i (2) zastosowanie unikalnego wielo-specyficznego enzymu, który pozwala na tworzenie potranskrypcyjnych modyfikacji w różnych miejscach w danym typie RNA, jak również w różnych substratach RNA, co jest zgodne z obserwacjami dotyczącymi Pusp1p.

Artykuł otrzymano 26 kwietnia 2001 r.

Zaakceptowano do druku 20 sierpnia 2001 r.

## Literatura

1. Massenet S, Ansmant I, Motorin Y, Branlant C (1999) *FEBS Letters* **462**: 94-100
2. Gu J, Chen Y, Reddy R (1998) *Nucleic Acids Res* **26**: 160-162
3. Massenet S, Mougin A, Branlant S (1998) w: Grosjean H i Benne R (red.) *Modification and Editing of RNA*. American Society for Microbiology Press, Washington, DC, str. 201-227
4. Becker HF, Motorin Y, Florentz C, Giege R, Grosjean H (1998) *Nucleic Acids Res* **26**: 3991-3997
5. Arluisson V, Hountondji C, Robert B, Grosjean H (1998) *Biochemistry* **37**: 7268-7276
6. Heiss NS, Knight SW, Vulliamy TJ, Klauck SM, Wiemann S, Mason PJ, Poustka A, Dokal I (1998) *Nat Genet* **19**: 32-38
7. Kammen HO, Marvel ChC, Hardy L, Penhoet EE (1988) *J Biol Chem* **263**: 2255-2263
8. Arena F, Ciliberto G, Ciampi S, Cortese R (1978) *Nucleic Acids Res* **5**: 4523-4536
9. Tsui HC, Arps PJ, Connolly DM, Winkler ME (1991) *J Bacteriol* **173**: 7395-7400
10. Nurse K, Wrzesiński J, Bakin A, Lane BG, Ofengand J (1995), *RNA* **1**: 102-112
11. Wrzesiński J, Bakin A, Nurse K, Lane BG, Ofengand J (1995) *Biochemistry* **34**: 8904-8913
12. Santer M, Santer U, Nurse K, Bakin A, Cunningham P, Zain M, O'Connell D, Ofengand J (1993) *Biochemistry* **32**: 5539-5547
13. Denman R, Negre D, Cunningham PR, Nurse K, Colgan J, Weitzmann C, Ofengand J (1989) *Biochemistry* **28**: 1012-1019
14. Conrad J, Niu L, Rudd K, Lane BG, Ofengand J (1999) *RNA* **5**: 751-763
15. Ofengand J, Bakin A, Wrzesiński J, Nurse K, Lane BG (1995) *Biochem Cell Biol* **73**: 915-924
16. Raychaudhuri S, Niu L, Conrad BG, Lane G, Ofengand J (1999) *J Biol Chem* **274**: 18880-18886
17. Niu L, Ofengand J (1999) *Biochemistry* **38**: 629-635
18. Gustafsson C, Reid R, Greene PJ, Santi DV (1996) *Nucleic Acids Res* **24**: 3756-3762
19. Huang L, Ku J, Pookanjanatavip M, Gu X, Wang D, Greene PJ, Santi DV (1998) *Biochemistry* **37**: 15951-15957
20. Conrad J, Sun D, Englund N, Ofengand J (1998) *J Biol Chem* **273**: 18562-18566
21. Raychandhuri S, Conrad J, Hall BG, Ofengand J (1998) *RNA* **4**: 1407-1417
22. Conrad J, Sun D, Englund N, Ofengand J (1998) *J Biol Chem* **273**: 18562-18566
23. Koonin EV (1996) *Nucleic Acids Res* **24**: 2411-2415
24. Lecoq F, Simos G, Sauer A, Hurt EC, Motorin Y, Grosjean H (1998) *J Biol Chem* **273**: 1316-1323
25. Climic S, Ruiz-Perez L, Gonzalez-Pacanowska D, Prapunwattana P, Cho S-W, Stroud R, Santi DV (1990) *J Biol Chem* **265**: 18776-18779
26. Huang L, Pookanjanatavip M, Gu X, Santi DV (1998) *Biochemistry* **37**: 344-351
27. Ramamurthy V, Swann SL, Paulson JL, Spedaliere ChJ, Mueller EG (1999) *J Biol Chem* **274**: 22225-22230
28. Foster PG, Huang L, Santi DV, Stroud RM (2000) *Nature Structural Biology* **7**: 23-27
29. Gannot P, Bortolin ML, Kiss T (1997) *Cell* **89**: 799-809
30. Philips B, Billin AN, Cadwell C, Buchholz R, Erickson C, Merriam JR, Carbon J, Poole SJ (1998) *Mol Gen Genet* **260**: 20-29
31. Lafontaine DLJ, Bousquet-Antonelli C, Henry Y, Caizergues-Ferrer M, Tollervey D (1998) *Genes and Dev* **12**: 527-537
32. Ansmant I, Massenet S, Grosjean H, Motorin Y, Branlant C (2000) *Nucleic Acids Res* **28**: 1941-1946
33. Simos G, Tekotte H, Grosjean H, Segref A, Sharma K, Tollervey D, Hurt EC (1996) *EMBO J* **15**: 2270-2284
34. Motorin Y, Keith G, Simon C, Foiret D, Simos G, Hurt E, Grosjean H (1998) *RNA* **4**: 856-869
35. Massenet S, Motorin Y, Lafontaine DLJ, Hurt EC, Grosjean H, Branlant C (1999) *Mol Cell Biol* **19**: 2142-2154
36. Szweykowska-Kulińska Z, Senger B, Keith G, Fasiolo F, Grosjean H (1994) *EMBO J* **13**: 4636-4644
37. Ni J, Tien AL, Fournier MJ (1997) *Cell* **89**: 565-573
38. Chen J, Patton JR (1999) *RNA* **5**: 409-419
39. Hellmuth K, Grosjean H, Motorin Y, Deinert K, Hurt E, Simos G (2000) *Nucleic Acids Res* **28**: 4604-4610
40. Chen J, Patton J (2000) *Biochemistry* **39**: 12723-12730
41. Becker HF, Motorin Y, Planta RJ, Grosjean H (1997) *Nucleic Acids Res* **25**: 4493-4499
42. Jiang W, Middleton K, Yoon HJ, Fouquet C, Carbon J (1993) *Mol Cell Biol* **13**: 4884-4893
43. Zebardjian Y, King T, Fournier MJ, Clarke L, Carbon J (1999) *Mol Cell Biol* **19**: 7461-7472
44. Watkins NJ, Gottschalk A, Neubauer G, Kastner B, Fabrizio P, Mann M, Luhrmann R (1998) *RNA* **4**: 1549-1568
45. Meier UT, Blobel G (1994) *J Cell Biol* **127**: 1505-1514
46. Luzzatto L, Karadimitris A (1998) *Nat Genet* **19**: 6-7
47. Mitchell JR, Wood E, Collins K (1999) *Nature* **402**: 551-555



# Informacja genetyczna pod kontrolą — rola eukariotycznej topoizomerazy I

## Genetic information under control — role of eukaryotic topoisomerase I

RAFAŁ A. DERLACZ

### Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Klasyfikacja topoizomeraz
- III. Rozmieszczenie topoizomerazy I w komórce
- IV. Budowa białka topoizomerazowego
  - IV-1. Domeny: N-końcowa i łącznikowa
  - IV-2. Część globularna
- V. Relaksacja DNA
- VI. Wrażliwość topoizomerazy I na kamptotecynę
- VII. Udział topoizomerazy I w procesach komórkowych
  - VII-1. Usuwanie napięcia torsyjnego
  - VII-2. Obróbka pre-mRNA
  - VII-3. Rekombinacja
  - VII-4. Aktywność rybonukleazy
  - VII-5. Kondensacja chromatyny
  - VII-6. Inicjacja transkrypcji
- VIII. Regulacja poziomu białka i aktywności relaksacyjnej topoizomerazy I
  - VIII-1. Regulacja transkrypcji
  - VIII-2. Modyfikacje posttranslacyjne
  - VIII-3. Oddziaływanie z innymi białkami
- IX. Podsumowanie

### Contents:

- I. Introduction
- II. Classification of topoisomerases
- III. Subcellular localisation of topoisomerase I
- IV. Structure of topoisomerase I protein
  - IV-1. N-terminal and linker domains
  - IV-2. Globular part
- V. DNA relaxation
- VI. Sensitivity of topoisomerase I to camptotecin
- VII. Participation of topoisomerase I in cellular processes
  - VII-1. Torsional stress elimination
  - VII-2. mRNA splicing
  - VII-3. Recombination
  - VII-4. Ribonuclease activity
  - VII-5. Chromatin condensation
  - VII-6. Transcription initiation
- VIII. Regulation of protein level and relaxation activity
  - VIII-1. Transcriptional regulation
  - VIII-2. Posttranslational modifications
  - VIII-3. Interactions with other proteins
- IX. Summary

**Wykaz stosowanych skrótów:** białka SR — białka bogate w reszty seryny i argininy, bp — par zasad, cdc — białko uczestniczące w kontroli cyklu komórkowego, CK2 — kinaza kazeinowa 2, CPT — kamptotecyna, EGF — nabłonkowy czynnik wzrostu, MAP1 — kinaza białkowa aktywowana przez mitogen, NLS — sygnał lokalizacji jądrowej, PCNA — jądrowy antygen proliferujących komórek, PKC — kinaza białkowa C, PSF/p54<sup>nrB</sup> — kompleks białkowy uczestniczący w składaniu cząsteczek pre-mRNA, rDNA — DNA kodujący geny rRNA, SF2/ASF — białko SR uczestniczące w składaniu cząsteczek pre-mRNA, SMC — białko odpowiedzialne za utrzymanie struktury chromosomu, SRPK — kinaza białkowa specyficzna względem białek SR, SV40 — małpi wirus 40, TBP — białko wiążące sekwencję TATA, *TOP1* — gen topoizomerazy I, *top1* — zmutowany gen topoizomerazy I

### I. Wstęp

Informacja genetyczna komórki eukariotycznej zapisana jest w jednym, bądź kilku długich łańcuchach DNA, upakowanych w sposób wielokrotnie zmniejszający zajmowaną przez nie przestrzeń. Spakowanie DNA w gigantyczny kompleks białko-nukleinowy pozwala komórce na zachowanie niewielkich rozmiarów. Niemniej powielanie i odczytywanie zawartej w nim informacji zmusza do uruchamiania licznych układów kontrolujących organizację przestrzenną takiego kompleksu. Za konformację cząsteczki DNA odpowiedzialne są topoizomerazy, enzymy utrzymujące równowagę między różnymi formami przestrzennymi DNA. Biorą one udział we wszystkich procesach zmieniających przestrzenną organizację genomu [1].

Rola eukariotycznej topoizomerazy I nie ogranicza się wyłącznie do usuwania naprężeń po-



wstających w DNA podczas transkrypcji i replikacji [2]. Jest ona: (i) kinazą odpowiedzialną za fosforylację białek uczestniczących w obróbce mRNA [3, 4], (ii) specyficzną endorybonukleazą [5], (iii) rekombinazą [6], a także (iv) czynnikiem zdolnym do hamowania, bądź stymulowania transkrypcji [7,8]. Ważną cechą topoizomerazy I jest wrażliwość na kamptotecynę (CPT) [9] — alkaloid, którego pochodne wykorzystuje się jako leki przeciwnowotworowe [10].

## II. Klasyfikacja topoizomeraz

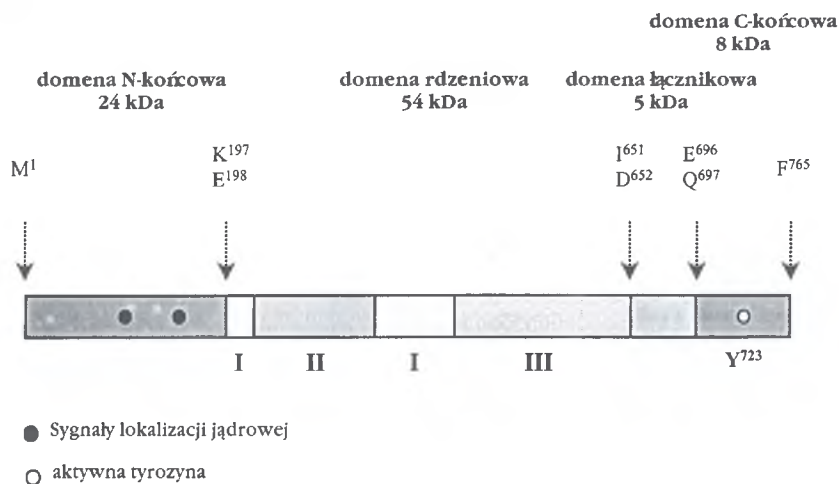
Topoizomerazy można identyfikować na podstawie tworzonych przez nie przejściowych połączeń z DNA zwanych kompleksami rozszczepialnymi (ang. *cleavable complex*). Wyróżnia się dwa typy enzymów [1, 11]. Topoizomerazy typu I, przecinające jedną z nici DNA, wiążą się kowalencyjnie bądź z 5' końcem (typ IA), bądź z 3' końcem (typ IB) przeciętej nici. Omawiana niżej eukariotyczna topoizomeraza I jest topoizomerazą typu IB. Prawie wszystkie topoizomerazy typu I są białkami monomerycznymi, a ich aktywność nie zależy od energii dostarczonej przez ATP [1, 12]. Jedyny wyjątek stanowi, zależny od ATP, enzym wyizolowany z *Methanopyrus kandleri*, który funkcjonuje jako dimer [13, 14]. Topoizomerazy typu II, które tną obie nici DNA, wiążą

μg/ml [17], a lokalne zawartości mogą być jeszcze wyższe. Przemiesza się ona bowiem do aktywnych transkrypcyjnie rejonów genomu, gdzie intensywnie zmieniane jest napięcie torsyjne DNA. I tak, stężenie topoizomerazy I w jąderku, gdzie zachodzi intensywna transkrypcja rDNA, może 20-krotnie przewyższać stężenie w pozostałych rejonach chromatyny [18]. Przemieszczanie się jej do rejonów aktywnych transkrypcyjnie wynika ze zwiększonego powinowactwa enzymu do krzyżujących się odcinków DNA, szczególnie obficie występujących w DNA superhelikalnym [19]. Ciekawe, że u organizmów, których komórki zawierają pozachromosomowe rDNA, topoizomeraza I wiąże się do niego poprzez unikatową 16 nukleotydową sekwencję [20].

Enzym ten wyizolowano także z mitochondriów [1, 12].

## IV. Budowa białka topoizomerazowego

Ludzka topoizomeraza I jest monomerycznym białkiem o długości 765 aminokwasów, zbudowanym z czterech głównych domen [16]: (i) domeny N-końcowej, (ii) domeny rdzeniowej, w skład której wchodzi trzy subdomeny, (iii) domeny łącznikowej oraz (iv) domeny C-końcowej, zawierającej aktywną katalitycznie Y<sup>723</sup> (Ryc. 1). Dwie z nich, domena



Ryc. 1. Budowa domenowa topoizomerazy I. I, II, III – subdomeny domeny rdzeniowej.

reszty fosforanowe na 5' końcach. Działają one jako dimery (eukariota) lub tetramery (prokariota), a katalizowana przez nie reakcja wymaga dostarczenia energii związanej w ATP [12].

## III. Rozmieszczenie topoizomerazy I w komórce

Topoizomeraza I to jądrowy enzym [15], który podczas mitozy pozostaje związany z chromatydami [16]. Jej stężenie w jądrach komórek HeLa sięga 100

rdzeniowa i C-końcowa są silnie konserwowane i niezbędne dla zachowania aktywności relaksacyjnej. Domeny łącznikowa i N-końcowa to rejony o dużej zmienności, których usunięcie nie powoduje utraty zdolności topoizomerazy I do relaksacji DNA [21, 22].

### IV-1. Domeny: N-końcowa i łącznikowa

Obserwuje się wyraźne różnice w długości zarówno domeny N-końcowej, jak i domeny łącznikowej

topoizomeraz I pochodzących z różnych organizmów. Cechą wspólną obu domen jest (i) wysoka zawartość aminokwasów obdarzonych ładunkiem, która zmienia się od około 32% u *Arabidopsis thaliana* do około 70% u *Caenorabditis elegans* i człowieka oraz (ii) obecność reszt serynowych, których ewentualna fosforylacja będzie powodować wprowadzenie dodatkowego ładunku, zmieniającego ładunek całej domeny. Gdyby wszystkie seryny omawianego rejonu zostały ufosforylowane, to gęstość ładunku domeny N-końcowej byłaby niemal identyczna dla różnych topoizomeraz typu IB [23].

Domena N-końcowa topoizomerazy I jest miejscem wrażliwym na proteolizę [24]. W przypadku ludzkiego enzymu reszty od 1 do 230 mogą być usunięte, co nie powoduje utraty aktywności relaksacyjnej [25], która zanika dopiero po usunięciu kolejnych 16 aminokwasów [26]. Domena łącznikowa może również ulegać proteolizie, lecz proces ten jest wolniejszy w obecności DNA [27]. Domena ta może istnieć w dwu stanach: (i) „otwartym” — wrażliwym na trawienie proteolityczne, wówczas gdy topoizomeraza I nie jest związana z DNA lub jest z nim związana kowalencyjnie oraz (ii) „zamkniętym” — odpornym na trawienie, kiedy topoizomeraza I jest niekowalencyjnie związana z DNA. Sugeruje to możliwość przełączania stanu domeny łącznikowej, a więc i stanu całej cząsteczki podczas formowania kompleksu rozszczepialnego.

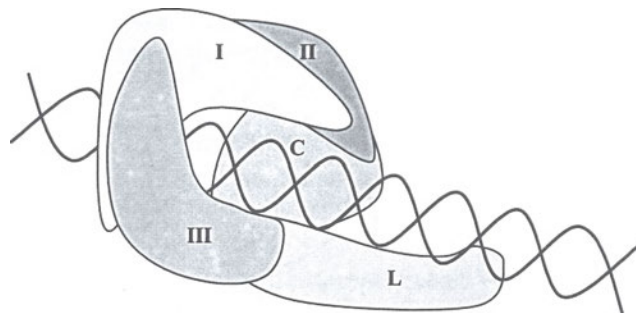
Domena N-końcowa zawiera dwa niezależne sygnały lokalizacji jądrowej (ang. *NLS – nuclear localisation signal*). Pierwszy stanowią kwaśne reszty aminokwasowe 117-146 [28], drugi reszty zasadowe 150-156 [16]. Końcowy fragment tej domeny (reszty 166-210), dzięki oddziaływaniu z nukleoliną [29], odpowiada za lokalizację topoizomerazy I na obszarze jąderka [30]. W przypadku topoizomerazy I z *Drosophila* domena N-końcowa zawiera dwuczęściowy sygnał lokalizacji jądrowej (reszty 135-150) i warunkuje jej obecność w aktywnych transkrypcyjnie miejscach chromatyny [31]. Obecność topoizomerazy I w kompleksie transkrypcyjnym można tłumaczyć; z jednej strony jej powinowactwem do powstającego podczas transkrypcji superheliksu [2]; z drugiej, wiązaniem się z kompleksem transkrypcyjnym dzięki oddziaływaniom typu białko:białko [7, 8].

#### IV-2. Część globularna

Struktura domen: rdzeniowej i C-końcowej eukariotycznych topoizomeraz I jest silnie konserwowana. Tworzą one zasadniczą dla aktywności relaksa-

cyjnej globularną część enzymu. Wykazano, że zmieszanie ze sobą nieaktywnych katalitycznie: 58 kDa domeny rdzeniowej z 6,3 kDa domeną C-końcową, prowadzi do odtworzenia aktywności relaksacyjnej [21]. Podobnie, jednoczesne wyrażanie cDNA kodującego obie domeny w komórkach drożdży prowadzi do odtworzenia aktywności relaksacyjnej topoizomerazy I *in vivo* [22].

Część globularna topoizomerazy I otacza ściśle cząsteczkę DNA w sposób przypominający klamrę (Ryc. 2), której górną połowę tworzą wiążące się sil-



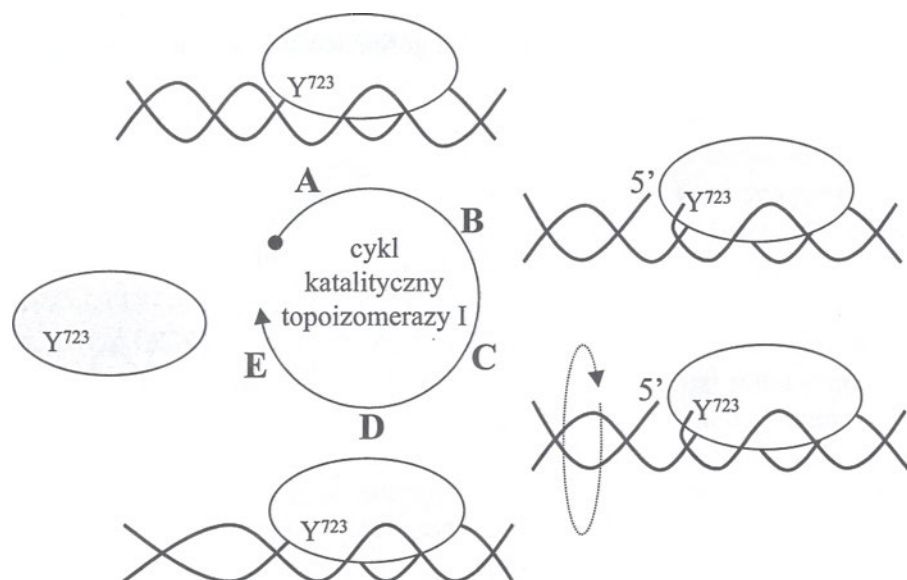
Ryc. 2. Kompleks, w którym topoizomeraza I jest niekowalencyjnie połączona z cząsteczką DNA. I, II, III – subdomeny domeny rdzeniowej, C – domena C-końcowa, L – domena łącznikowa. Na schemacie nie zaznaczono domeny N-końcowej.

nie ze sobą I i II subdomeny rdzeniowe, podczas gdy część dolna odpowiada III subdomenie rdzeniowej uzupełnionej domeną C-końcową [32-34]. Subdomena III zawiera wszystkie istotne katalitycznie reszty topoizomerazy I ( $R^{488}$ ,  $R^{590}$ ,  $H^{632}$ ), za wyjątkiem  $Y^{723}$ . Ciągnie się ona od górnej części klamry ku jej dołowi poprzez dwa długie  $\alpha$  heliksy spełniające funkcję zawiasów, pozwalających na otwieranie i zamykanie cząsteczki wokół DNA. Oddziałuje ona z subdomeną I dzięki krótkim pętłom leżącym po przeciwnej stronie od „zawiasów”, a także z dopełniającą klamrę, zawierającą aktywną  $Y^{723}$  domeną C-końcową. Leżącą między nimi domeną łącznikową tworzą dwa długie antyrównoległe  $\alpha$  heliksy, połączone krótkim skrętem, których powierzchnia zwrócona w kierunku DNA jest naładowana dodatnio.

Trzy subdomeny rdzeniowe oraz domena C-końcowa tworzą globularny kompleks o wymiarach 70 na 60 na 60 Å. W jego centrum znajduje się otwór o średnicy około 15-20 Å, który jest wyścielony resztami aminokwasowymi o dodatnim ładunku. Reszty te podczas oddziaływania topoizomerazy I z DNA niwelują ujemny ładunek szkieletu cukrowo-fosforanowego [32].

## V. Relaksacja DNA

W cyklu katalitycznym topoiizomerazy I można wyróżnić pięć etapów: (a) wiązanie DNA, (b) rozcinanie jednej nici DNA, (c) uwalnianie napięcia torsyjnego, (d) religację (odtworzenie ciągłości nici) oraz kończące cały proces (e) odłączenie od DNA i przemieszczenie na inną cząsteczkę substratu (Ryc. 3).



Ryc. 3. Cykl katalityczny topoiizomerazy I. A – wiązanie DNA, B – rozcinanie jednej z nici, C – uwalnianie napięcia torsyjnego (rotacja nici DNA), D – religacja (odtworzenie ciągłości nici), E – odłączenie od DNA.

Topoiizomeraza I wiąże się wyłącznie z dwuniciowym DNA, a ponadto znacznie efektywniej z DNA superhelikalnym, niż z cząsteczką liniową [1, 18, 35]. Choć nie należy mówić o specyficznej sekwencji DNA odpowiedzialnej za wiązanie eukariotycznej topoiizomerazy I, to ustalono, że najlepiej rozpoznawany jest motyw (A/T)(G/A/C)(A/T)T<sup>^</sup> (T<sup>^</sup> – miejsce cięcia) [36]. Podobną, rozpoznawaną przez topoiizomerazę I sekwencję AGACTT<sup>^</sup>AG, wykryto w rDNA *Tetrahymena thermophilus* [37].

Topoiizomeraza I wiąże się głównie z resztami fosforanowymi DNA, co tłumaczy niespecyficzność jej oddziaływania z obszarami o różnej sekwencji nukleotydowej. Jedynie w 4 z 41 bezpośrednich wiązań topoiizomerazy I z DNA nie biorą udziału grupy fosforanowe. Dotyczy to reszt R<sup>364</sup> i K<sup>532</sup> lokujących się w dużej bruździe, w sąsiedztwie miejsca cięcia. O ile oddziaływanie między resztą R<sup>364</sup> a DNA także jest niespecyficzne i zachodzi z udziałem atomów tlenu deoksyrybozy i różnych zasad w zależności od struktury DNA, o tyle reszta K<sup>532</sup> odpowiada za jedyne specyficzne wiązanie w kompleksie ludzkiej topoiizomerazy I z DNA i jest konserwowana we wszystkich znanych topoiizomerazach typu IB. Wiązanie wodorowe powstaje między grupą aminową łańcucha bocznego K<sup>532</sup>, a atomem O2 tymidyny (T<sup>^</sup>) [38, 39].

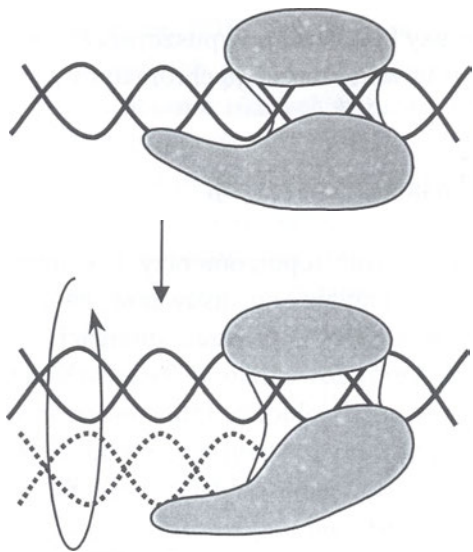
Topoiizomeraza I przecina jedną z nici podwójnego heliksu DNA z jednoczesnym wytworzeniem wiązania fosfoestrowego między 3' fosforanem przeciętej nici a grupą hydroksylową tyrozyny centrum aktywnego, uwalniając tym samym grupę 5' hydroksylową [40]. Centrum aktywne ludzkiej topoiizomerazy I zbudowane jest z układających się ściśle wokół atomu fosforu przeciętej nici reszt R<sup>488</sup>, R<sup>590</sup>, H<sup>632</sup> i oczywiście Y<sup>723</sup>. Kompleks rozszczepialny jest

stabilizowany przez reszty R<sup>488</sup>, R<sup>590</sup> oraz H<sup>632</sup>, które leżą w odległości pozwalającej na utworzenie wiązań wodorowych z wolnymi atomami tlenu grupy 3' fosforanowej związanej kowalencyjnie do Y<sup>723</sup> [33, 39, 40].

Reakcja religacji zachodzi prawdopodobnie poprzez zmianę stanu pośredniego stabilizowanego przez wspomniane reszty [33, 38, 39, 41]. Ciągłość nici zostaje odtworzona dzięki wolnej grupie 5' hydroksylowej, która pełni funkcję czynnika nukleofilowego zrywającego wiązanie fosfotyrozynowe [1, 42]. Kompleks rozszczepialny może być likwidowany przez endogenne fosfodiesterazy [42, 43].

Najbardziej prawdopodobny, wynikający ze struktury określonej dla ludzkiego enzymu, model działania eukariotycznych topoiizomerazy I to tzw. model „rotacji kontrolowanej”, który schematycznie przedstawiono na rycinie 4. Model ten zakłada rotację całej cząsteczki DNA wokół ciągłej nici, jednak jej swoboda jest ograniczana przez dodatkowo naładowane obszary enzymu. Wewnętrzny rejon topoiizomerazy I charakteryzuje się obecnością 16 konserwowanych, reszt aminokwasowych o ładunku dodatnim, które tworzą wokół DNA pierścień niwelujący ujemny ładunek szkieletu cukrowo-fosforanowego [21, 34].





Ryc. 4. Schemat ilustrujący hipotetyczny model rotacji kontrolowanej. Obracający się DNA jest podtrzymywany przez domenę łącznikową topoiizomerazy I.

Klamrę otaczającą DNA, utworzoną przez globularną część enzymu można porównać do dłoni autostopowicza. DNA jest trzymany między palcami (subdomeny I i II), a dłonią (subdomena III i domena C-końcowa), podczas gdy łącznik odpowiada wyprostowanemu kciukowi. Uneruchomiony DNA jest przecinany, a następnie lekkie zluźnienie uchwytu pozwala na kontrolowaną rotację całej cząsteczki. Kciuk — łącznik podtrzymuje obracający się DNA [34]. Energia umożliwiająca rotację jest uwalniana stopniowo w trakcie relaksacji superhelikalnej cząsteczki DNA.

## VI. Wrażliwość topoiizomerazy I na kamptotecynę

Kamptotecyna (CPT) to alkaloid o silnym działaniu przeciwnowotworowym, który wyizolowano ponad 30 lat temu z chińskiego drzewa Xi Shu, *Camptotheca accuminata*. Niestety, poważne skutki uboczne podawania CPT spowodowały, że nie wprowadzono jej wówczas jako leku do stosowania klinicznego [44]. Obecnie z powodzeniem stosuje się w medycynie liczne, łatwo rozpuszczalne w wodzie pochodne CPT, takie jak topotecan (Hycamtin), CPT11 (Irinotecan), czy 9-aminokamptotecyna (9-AC) [10, 42, 47, 48]. Wewnątrzkomórkowym miejscem działania CPT i jej pochodnych jest topoiizomeraza I [9].

Kamptotecyna wiąże swoiście kompleks rozszczepialny, prowadząc do powstania stabilnego kowalencyjnego połączenia DNA i topoiizomerazy I [45]. Grupa 5' hydroksylowa przeciętej nici DNA zostaje odepchnięta na odległość około 4,5 Å od 3' grupy fosforanowej, co uniemożliwia religację. Kompleks

topoiizomerazy I:DNA:CPT stanowi zawadę przestrzenną, a zderzenie się z nim polimerazy DNA prowadzi do rozpadu widełek replikacyjnych i zerwania ciągłości nici [46].

Do niedawna nie było wiadomo, dlaczego komórki nowotworowe są selektywnie zabijane przez pochodne CPT. Jak się okazało istnieje specyficzna względem topoiizomerazy I proteaza, odpowiedzialna za szybki obrót tego enzymu w komórkach spoczynkowych. Proteaza ta, likwidująca kompleksy topoiizomerazy I:DNA:CPT, nie występuje w komórkach nowotworowych [49].

## VII. Udział topoiizomerazy I w procesach komórkowych

### VII-1. Usuwanie napięcia torsyjnego

Przemieszczanie się widełek replikacyjnych powoduje wytwarzanie pozytywnego superheliksu przed poruszającym się kompleksem. Podobnie rozplecenie DNA podczas transkrypcji, choć zachodzi na względnie krótkim odcinku i jest przejściowe, powoduje gromadzenie się pozytywnego superheliksu przed, ale także negatywnego za poruszającą się polimerazą RNA [50]. Topoiizomeraza I, która towarzyszy polimerazom, usuwa naprężenia z cząsteczki DNA i umożliwia tym samym przemieszczanie się zarówno kompleksu replikacyjnego, jak i transkrypcyjnego [1, 51].

### VII-2. Obróbka pre-mRNA

Topoiizomeraza I jest odpowiedzialna, obok kinaz cdc2 (ang. *cell division cycle 2*) i SRPK's (ang. *SR-protein-specific kinases*), za fosforylację bogatych w reszty argininy i seryny białek SR uczestniczących w składaniu cząsteczek pre-mRNA [3, 4]. Za wiązanie substratu — białka SF2/ASF (ang. *splicing factor 2/alternative splicing factor*) odpowiada domena N-końcowa topoiizomerazy I [52]. Warto podkreślić, że tyrozyna istotna dla relaksacji DNA jest zbędna podczas reakcji fosforylacji [53]. Obok wiązania przez topoiizomerazę I czynnika SF2/ASF, wykazano bezpośrednie oddziaływanie między topoiizomerazą I, a innym czynnikiem uczestniczącym w obróbce RNA — wiążącym trakty pirymidynowe białkiem PSF (ang. *protein-associated splicing factor*). Białko PSF występuje w jądrze w postaci heterodimerów z wiążącym RNA białkiem p54<sup>nrb</sup>. Kompleks PSF/p54<sup>nrb</sup> ułatwia przemieszczanie topoiizomerazy I między cząsteczkami DNA, stymulując tym samym jej aktywność relaksacyjną [54, 55].

### VII-3. Rekombinacja

Reakcja katalizowana przez topoizomerazę I, powodująca powstanie jednoniciowej przerwy w DNA, może indukować rekombinację. Doświadczenia z udziałem egzogennych odcinków DNA posiadających wolną grupę 5' hydroksylową sugerują udział topoizomerazy I w rekombinacji nieuprawnionej (ang. *illegitimate recombination*) [56], a także podczas integracji i wycinania genomu wirusowego do i z DNA gospodarza [57, 58]. Z drugiej strony, obserwowany w komórkach drożdży pozbawionych topoizomerazy I, wzrost poziomu rekombinacji był stymulowany przez superhelikalne DNA [59]. Tak więc, topoizomeraza I może indukować rekombinację, ale jednocześnie usuwając superheliks ograniczać jej intensywność [60]. Poznanie struktury topoizomerazy I wykazało jej podobieństwo do tzw. rekombinaz tyrozynowych [6, 61] oraz do integraz [62].

### VII-4. Aktywność rybonukleazy

Eukariotyczna topoizomeraza I może działać jak specyficzna endorybonukleaza i usuwać wstawione do DNA rybonukleotydy [5]. Mechanizm przecinania nici RNA i DNA jest podobny, z tą różnicą, że podczas relaksacji DNA topoizomeraza I jest uwalniana przez grupę 5' hydroksylową przeciętej nici, natomiast jeśli tnie w miejscu wstawienia rybonukleotydu jest uwalniana przez grupę 2' hydroksylową rybozy. Ta ostatnia reakcja prowadzi do powstania cyklicznego 2'-3' fosforanu na 3' końcu nici, co uniemożliwia religację. W ten sposób powstała w DNA przerwa jest rozpoznawana jako uszkodzenie i inicjuje procesy naprawcze usuwające ostatecznie rybonukleotydy.

### VII-5. Kondensacja chromatyny

W komórkach drożdży *Saccharomyces cerevisiae* nieprawidłową mitotyczną kondensację chromatyny zaobserwowano w podwójnych mutantach *top1 trf4* (ang. *top1-related function*). Charakteryzowały się one nieprawidłowym wydłużaniem wrzeciona podziałowego i nieprawidłową segregacją jąder potomnych, niemniej wykazywały normalną replikację [63]. Stwierdzono, że białko TRF4 oddziałuje z produktami genów *SMC1* i *SMC2* (ang. *structural maintenance of chromosomes*) [64], które są drożdżowymi odpowiednikami białek z *Xenopus* wymaganych do kondensacji chromatyny *in vitro*. Fakt, że białko TRF4 jest homologiczne do domeny N-końcowej to-

poizomerazy I pozwala przypuszczać, że jest ona zaangażowana w kondensację chromatyny w komórce [65].

### VII-6. Inicjacja transkrypcji

Pierwotnie rolę topoizomerazy I w transkrypcji ograniczano jedynie do usuwania naprężeń powstających w DNA podczas elongacji łańcucha RNA. Obecnie dowiedziono bezpośredniego oddziaływania między ludzką topoizomerazą I, a TBP (ang. *TATA binding protein*) oraz jej udział w stymulacji i represji inicjacji transkrypcji [7, 8]. Działanie to jest niezależne od aktywności relaksacyjnej i nie jest związane z nieswoistym oddziaływaniem z DNA [7]. Wykazano także, że w obecności aktywatora transkrypcji topoizomeraza I stymuluje powstawanie kompleksu transkrypcyjnego TFIID-TFIIA [66]. Jest możliwe, że biorąc udział w inicjacji transkrypcji topoizomeraza I przemieszcza się po jej rozpoczęciu na kompleks towarzyszący polimerazie RNA II podczas elongacji i usuwając powstające naprężenia umożliwia wydłużanie cząsteczki RNA. Obie funkcje: inicjacja transkrypcji i relaksacja DNA są prawdopodobnie niezależne.

## VIII. Regulacja poziomu białka i aktywności relaksacyjnej topoizomerazy I

Nasza wiedza o regulacji aktywności topoizomerazy I jest dość enigmatyczna. Po pierwsze, nie istnieje prosta zależność między poziomem *TOP1* mRNA, a poziomem białka [67]. Po drugie, choć wiadomo, że topoizomeraza I ulega modyfikacjom posttranslacyjnym, nie uważa się ich obecnie za najistotniejsze w regulacji aktywności relaksacyjnej. Po trzecie, istotna dla tej aktywności topoizomerazy I jest struktura chromatyny i lokalne modyfikacje dotyczące samego DNA [1, 42]. Wreszcie wydaje się, że jednym z podstawowych czynników regulujących działanie topoizomerazy I są różne białka wiążące się, bądź z DNA, bądź z nią samą [68].

### VIII-1. Regulacja transkrypcji

Genomy ludzki i myszy kodują po jednej kopii *TOP1* o homologii około 90% między nimi [69-71]. Ich obszar promotorowy posiada cechy charakterystyczne dla promotorów konstytutywnie transkrybowanych genów, tzw. „housekeeping genes” [69] oraz motywy rozpoznawane przez liczne czynniki transkrypcyjne [72].



Pomimo tego, że *TOP1* jest stale wyrażany we wszystkich komórkach jądrzastych, jego ekspresja może ulegać zmianom w różnych warunkach fizjologicznych [73-75]. Poziom *TOP1* mRNA nie jest jednak jednoznaczny z poziomem aktywności relaksacyjnej, a 10-krotny wzrost poziomu RNA dla topoizomerazy I nie powoduje wzrostu poziomu białka topoizomerazowego [67]. Dzieje się tak, gdyż zwiększonej syntezy topoizomerazy I towarzyszy jednocześnie jej szybka degradacja [73], która może być poprzedzona ubikwitynacją [76].

## VIII-2. Modyfikacje posttranslacyjne

**Ubikwitynacja:** W normalnych warunkach obserwuje się przyłączanie jedynie pojedynczych cząsteczek ubikwityny do topoizomerazy I, co nie jest sygnałem wystarczającym do jej degradacji. Poliubikwitynację enzymu stwierdzono w komórkach traktowanych CPT, co powodowało usunięcie około 25% białka już w 1-2 godz. po podaniu alkaloidu [76]. Jest możliwe, że wiązanie CPT zmienia konformację topoizomerazy I w taki sposób, że odsłania sekwencje stymulujące przyłączanie kolejnych reszt ubikwityny. Degradacja topoizomerazy I zachodzi także podczas apoptozy. Uczestniczą w niej kaspazy 3 i 6, których miejsca cięcia znajdują się w domenie N-końcowej [77].

**Poli(ADP-rybozylacja):** Poli(ADP-rybozylacja) obniża aktywność katalityczną topoizomerazy I *in vitro* [78]. Wykazano także, że inhibitory poli(ADP-rybozylacji) powodują wzrost wrażliwości komórek na CPT [79], a linie komórkowe ubogie w poli(ADP-rybozę) przejawiają hiperwrażliwość na ten alkaloid [80]. Endogenna synteza poli(ADP-rybozy) wzrasta w odpowiedzi na uszkodzenia DNA [81], jest więc możliwe, że poli(ADP-rybozylacja) topoizomerazy I obniża jej aktywność zmniejszając tym samym możliwość zajścia rekombinacji podczas naprawy DNA.

**Fosforylacja:** Topoizomeraza I jest fizjologicznym substratem co najmniej dwu kinaz: PKC (ang. *protein kinase C*) [82] oraz CK2 (ang. *casein kinase 2*) [83]. Analiza sekwencji aminokwasowej sugeruje możliwość jej fosforylacji także przez kinazę zależną od DNA (ang. *DNA dependent protein kinase*), kinazę *cdc2* oraz kinazę zależną od kinazy MAP1 (ang. *mitogen activated protein kinase 1*) [23].

Fosforylacji ulegają tylko reszty serynowe [83, 84], ale jej rola nie jest jasna. Zmianę stopnia ufosforylowania topoizomerazy I obserwowano w odpowiedzi na estry forbolu, insulinę i EGF (ang. *epidermal growth factor*) [85-87], a także podczas cyklu

komórkowego [16, 88]. W trakcie mitozy wzrasta poziom fosforylacji topoizomerazy I, natomiast przejście komórek do interfazy wiąże się z pojawieniem częściowo zdefosforylowanych form enzymu. Warto zaznaczyć, że zmiany poziomu fosforylacji topoizomerazy I w cyklu komórkowym, nie korelują ze zmianami aktywności relaksacyjnej.

PKC rozpoznaje reszty serynowe w motywach zasadowych i hydrofobowych, natomiast znacznikiem dla CK2 są kwaśne aminokwasy. Istnieje wobec tego możliwość, że fosforylacja topoizomerazy I *in vivo* przez te kinazy powoduje różne efekty. Istotna może być suma wprowadzonego ładunku ujemnego, a nie miejsce fosforylacji. W badaniach *in vitro* wykazano, że fosforylacja przez PKC lub CK2 przywraca aktywność zdefosforylowanej topoizomerazy I [82, 83]. Niemniej w doświadczeniach tych nie usuwano kinaz z układu, w którym przeprowadzano fosforylację. Jest więc możliwe, że stymulacja aktywności relaksacyjnej była wynikiem oddziaływania topoizomerazy I z badanymi kinazami. Potwierdza to doświadczenie, w którym wykazano, że CK2 stymuluje aktywność relaksacyjną topoizomerazy I przy braku ATP [89].

## VIII-3. Oddziaływanie z innymi białkami

Topoizomeraza I może funkcjonować w złożonych kompleksach białkowych [1, 7, 90, 91]. Oddziaływanie z innymi białkami decyduje o jej aktywności [54, 89, 92, 93], stabilności [94], rozmieszczeniu w komórce [91], a także wrażliwości na CPT [93]. Białka modulujące aktywność topoizomerazy I zebrano w Tabeli 1.

Pierwsze doniesienia o wpływie innych białek na aktywność relaksacyjną topoizomerazy I dotyczą białek strukturalnych chromatyny [95]. Histon H1 oraz mieszanina białek HMG (ang. *high mobility group*) stymulują aktywność relaksacyjną topoizomerazy I ponad 60-krotnie. Biorąc pod uwagę fakt, że pozytywnie naładowane poliaminy także stymulują aktywność topoizomerazy I, efekt ten można do pewnego stopnia tłumaczyć wysoką zawartością lizyny, zarówno w H1 (29%), jak i w białkach HMG (20-25%). Niemniej reszty obdarzone dodatnim ładunkiem nie są wystarczające do stymulacji relaksacji DNA, a wysokie stężenie polilizyny wręcz hamuje aktywność topoizomerazy I [89]. Efekt ten może mieć podobny charakter jak działanie wysokiego stężenia histonu H1, który przy stosunku jednej cząsteczki H1 na 40 bp DNA całkowicie hamuje aktywność relaksacyjną, prawdopodobnie przez to, że wygrywa współzawodnictwo z topoizomerazą I o



**Tabela 1**

Białka modulujące aktywność relaksacyjną topoiizomerazy I. Opisy skrótów nazw białek umieszczonych w tabeli znajdują się w wykazie stosowanych skrótów.

Białko	Miejsce wiązania z topoiizomerazą I	Wpływ na aktywność relaksacyjną	Piśmiennictwo
histon H1	brak danych	stymulacja albo hamowanie	[95]
HMG	brak danych	stymulacja	[95]
nukleolina	reszty 166-210	brak efektu	[29]
antygen T SV40	reszty 1-139 oraz 383-765	hamowanie	[100]
helikaza DNA z <i>Pisum sativum</i>	brak danych	stymulacja	[101]
hsc70	brak danych	ochrona przed inaktywacją	[94]
p53	brak danych	stymulacja	[92]
PSF/p54 <sup>nrb</sup>	brak danych	stymulacja	[54, 55]
tax	brak danych	hamowanie	[110]
p15	brak danych	stymulacja	[105]
topors	reszty 1-250	brak danych	[106]
Tof1p, Tof2p	brak danych	brak danych	[107]
SF2/ASF	reszty 1-174	brak danych	[53]
TBP	brak danych	brak danych	[7]
polimeraza RNA II	reszty1-315	brak danych	[8, 31]
PCNA	brak danych	hamowanie	[97]
polimeraza poli(ADP-rybozy)	brak danych	stymulacja	[108]
białka 25 i 33,5 kDa z <i>Xenopus</i>	domena N-końcowa	hamowanie	[109]

cząsteczkę DNA [96]. Wiele wskazuje na to, że efekt powodowany przez histon H1 i białka HMG zachodzi dzięki ich oddziaływaniu z DNA, a nie z topoiizomerazą I [68].

Wiązanie topoiizomerazy I przez białka zaangażowane w transkrypcję (TBP, podjednostki polimerazy RNA II, białko topors) nie jest raczej związane z regulacją aktywności relaksacyjnej, a decyduje o dołączeniu enzymu do kompleksu odpowiedzialnego za inicjację transkrypcji. Podobnie wiązanie z białkami biorącymi udział w obróbce RNA, nie decyduje o dołączeniu DNA, aczkolwiek wykazano wyraźną stymulację aktywności relaksacyjnej topoiizomerazy I przez kompleks PSF/p54<sup>nrb</sup> [54]. Zaskakujący jest wpływ PCNA (ang. *proliferating cell nuclear antigen*) na aktywność topoiizomerazy I [97]. Białko towarzyszące polimerazie DNA podczas elongacji [98] hamuje tę aktywność topoiizomerazy I, dzięki której umożliwia ona „wędrówkę” widełek replikacyjnych. Biorąc pod uwagę relaksację DNA, konieczną podczas replikacji i transkrypcji, szczególnie istotne wydają się oddziaływania między topoiizomerazą I, a helikazami i białkiem p53.

Współdziałanie topoiizomeraz i helikaz opisano po raz pierwszy przy replikacji faga X 174 [99], gdzie oddziaływanie między rep DNA helikazą a produktem genu A (specyficzna względem sekwencji nukleotydowej topoiizomeraza) pozwala na rozdzielanie replikowanych nici DNA. Wykazano, że eukariotyczna topoiizomeraza I oddziałuje z będącym helikazą antygenem T SV40 [100], nukleoliną [29], a także z helikazą wyizolowaną z *Pisum sativum* [101].

Antygen T wirusa SV40 (ang. *simian virus 40*) jest helikazą inicjującą replikację genomu wirusowego. Topoiizomeraza I przez fizyczne oddziaływanie z antygenem T stymuluje ten proces [102]. Z drugiej strony powstanie kompleksu topoiizomerazy I z antygenem T hamuje relaksację DNA [93]. Antygen T może konkurować o domenę N-końcową topoiizomerazy I z inną helikazą — nukleoliną [91]. Jest ona jądrowym, silnie ewolucyjnie konserwowanym białkiem, które stanowi w przybliżeniu około 5% masy jąderka. Nukleolina zaangażowana jest między innymi w utrzymanie struktury jąderka, powstawanie rybosomów, transport między cytoplazmą a jądrem komór-

kowym, replikację, transkrypcję i kondensację chromatyny [103]. W przeciwieństwie do antygeny T nukleolina nie wywiera żadnego wpływu na relaksację DNA [29]. Helikazą, która stymuluje aktywność relaksacyjną topoizomerazy I jest enzym wyizolowany z *Pisum sativum* [101].

Zarówno nukleolina jak i antygen T SV40 wiążą się z domeną N-końcową topoizomerazy I. Wiązanie to w obu przypadkach nie wymaga ani DNA, ani żadnego dodatkowego białka. Oddziaływanie z helikazami jest więc prawdopodobnie jedną z funkcji domeny N-końcowej topoizomerazy I [91]. Jest to szczególnie interesujące, gdyż rozplatanie przez helikazy DNA, ze względu na powstający superheliks, staje się topologicznie atrakcyjny dla topoizomerazy I [90].

Białko p53, zwane także supresorem nowotworów, jest kluczowe dla utrzymania integralności genomu. Jego olbrzymie znaczenie dla komórki potwierdza fakt, że w przypadku ponad 50% nowotworów gen kodujący to białko jest zmutowany [104]. W komórkach linii MCF7 i NIH 3T3 traktowanych odpowiednio mitomycyną C i aktynomycyną obserwowano wzrost aktywności topoizomerazy I oraz nagromadzenie się białka p53. Stymulacja topoizomerazy I dotyczyła zarówno aktywności relaksacyjnej, jak i zdolności do fosforylacji białka SF2/ASF [92]. Aktywacja topoizomerazy I/kinazy nie zależy od wiązania p53 do DNA, a efekt ten obserwowano *in vitro* już przy równomolowym stosunku obu białek. Z kolei wzrost aktywności relaksacyjnej obserwowano dopiero przy 10-krotnym molowym nadmiarze p53 wobec topoizomerazy I.

## IX. Podsumowanie

Badania ostatnich lat dostarczyły wielu zaskakujących informacji zarówno na temat funkcji jakie topoizomeraza I może pełnić w komórce, jak również na temat sposobów ich regulowania. Wiele przemawia za tym, że o jej funkcjonowaniu decyduje przede wszystkim zdolność do tworzenia kompleksów z różnymi białkami. Fakt, że topoizomeraza I bierze udział nie tylko w usuwaniu naprężeń powstających w DNA, ale także w inicjacji transkrypcji i obróbce mRNA pozwala uznać ją za niezwykley enzym, „stojący na granicy między światem DNA i RNA”. Kwestią otwartą pozostaje czy wiązanie topoizomerazy I z innymi białkami decyduje o przełączaniu jej aktywności.

Artykuł otrzymano 25 stycznia 2001 r.

Zaakceptowano do druku 2 lipca 2001 r.

## Piśmiennictwo

1. Wang JC (1996) *Annu Rev Biochem* **65**: 635-692
2. Liu FL, Wang JC (1987) *Proc Natl Acad Sci USA* **84**: 7024-7027
3. Rossi F, Labourier E, Forne T, Divita G, Derancourt J, Riou JF, Antoine E, Cathala G, Brunel C, Tazi J (1996) *Nature* **381**: 80-82
4. Tazi J, Rossi F, Labourier E, Gallouzi I, Brunel C, Antoine E (1997) *J Mol Med* **75**: 786-800
5. Burgin Jr AB (1997) *Cell* **91**: 873-874
6. Sherratt DJ, Wigley DB (1998) *Cell* **93**: 149-152
7. Merino A, Madden KR, Lane WS, Champoux JJ, Reinberg D (1993) *Nature* **365**: 227-232
8. Kretzschmar M, Meisterernst M, Roeder RG (1993) *Proc Natl Acad Sci USA* **90**: 11508-11512
9. Hsiang YH, Hertzberg R, Hecht S, Liu LF (1985) *J Biol Chem* **260**: 14873-14878
10. Bailly C (2000) *Curr Med Chem* **7**: 39-58
11. Roca J (1995) *Trends Biochem Sci* **20**: 156-160
12. Gupta M, Fujimori A, Pommier Y (1995) *Biochim Biophys Acta* **1262**: 1-14
13. Kozyavkin SA, Krah R, Gellert M, Stetter KO, Lake JA, Slesarev AI (1994) *J Biol Chem* **269**: 11081-11089
14. Krah R, Kozyavkin SA, Slesarev AI, Gellert M (1996) *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 106-110
15. Meyer KN, Kjeldsen E, Straub T, Knudsen BR, Hickson ID, Kikuchi A, Kreipe H, Boege F (1997) *J Cell Biol* **136**: 775-788
16. Mo YY, Wang P, Beck WT (2000) *Exp Cell Res* **256**: 480-490
17. Stewart L, Ireton GC, Champoux JJ (1996) *J Biol Chem* **271**: 7602-7608
18. Muller MT, Pfund WP, Mehta VB, Trask DK (1985) *EMBO J* **4**: 1237-1243
19. Zechiedrich EL, Osheroff N (1990) *EMBO J* **9**: 4555-4562
20. Bonven BJ, Gocke E, Westergaard O (1985) *Cell* **41**: 541-551
21. Stewart L, Ireton GC, Champoux JJ (1997) *J Mol Biol* **269**: 355-372
22. Park H, Sternglanz R (1998) *Chromosoma* **107**: 211-205
23. Staroń K, Samuels DS (1998) *Mol Biol Rep* **25**: 157-161
24. Liu LF, Miller KG (1981) *Proc Natl Acad Sci USA* **78**: 3487-3491
25. Alsner J, Svejstrup JQ, Kjeldsen E, Sorensen BS, Westergaard O (1992) *J Biol Chem* **267**: 12408-12411
26. Kikuchi A, Miyaike M (1993) w *Molecular Biology of DNA Topoisomerases and Its Application to Chemotherapy* (Andoh T, Ikeda H, Oguro M red.) str. 121-130 CRC Press Inc Boca Raton FL
27. Stewart L, Ireton GC, Parker LH, Madden KR, Champoux JJ (1996) *J Biol Chem* **271**: 7593-7601
28. Mo YY, Wang C, Beck WT (2000) *J Biol Chem* **275**: 41107-41113
29. Bharti AK, Olson MOJ, Kufe DW, Rubin EH (1996) *J Biol Chem* **271**: 1993-1997
30. Edwards TK, Saleem A, Shaman JA, Dennis T, Gerigk C, Oliveros E, Gartenberg MR, Rubin EH (2000) *J Biol Chem* **275**: 36181-36188
31. Shaiu W-L, Hsieh T-S (1998) *Mol Cell Biol* **18**: 4358-4367
32. Redinbo MR, Stewart L, Kuhn P, Champoux JJ, Hol WGJ (1998) *Science* **279**: 1504-1513
33. Redinbo MR, Champoux JJ, Hol WGJ (1999) *Curr Opin Struct Biol* **9**: 29-36
34. Berger JM (1998) *Biochim Biophys Acta* **1400**: 3-18
35. Caserta M, Amadei A, Camillioni G, Di Mauro E (1990) *Biochemistry* **29**: 8152-8157
36. Been MD, Burgess RR, Champoux JJ (1984) *Nucleic Acids Res* **12**: 3097-3114

37. Andersen AH, Gocke E, Bonven BJ, Nielsen OF, Westergaard O (1985) *Nucleic Acids Res* 13: 1543-1557
38. Stewart L, Redinbo MR, Qiu X, Hol WGJ, Champoux JJ (1998) *Science* 279: 1534-1541
39. Redinbo MR, Champoux JJ, Hol WG (2000) *Biochemistry* 39: 6832-6840
40. Champoux JJ (1981) *J Biol Chem* 256: 4805-4809
41. Yang Z, Champoux JJ (2001) *J Biol Chem* 276: 677-685
42. Pommier Y, Pourquier P, Fan Y, Strumberg D (1998) *Biochim Biophys Acta* 1400: 83-106
43. Pouliot JJ, Yao KC, Robertson CA, Nash HA (1999) *Science* 286: 552-555
44. Slichenmyer WJ, Rowinsky EK, Donehower RC, Kaufmann SH (1993) *J Natl Cancer Inst* 85: 271-291
45. Hertzberg RP, Caranfa MJ, Hecht SM (1989) *Biochemistry* 28: 4629-4638
46. Pommier Y (1996) *Seminars in Oncology* 23: Suppl 3 3-10
47. Kollmannsberger C, Mross K, Jakob A, Kanz L, Bokemeyer C (1999) *Oncology* 56: 1-12
48. Pindur U, Lemster T (1998) *Pharmazie* 53: 79-86
49. Chen HJ, Hwong CL, Wang CH, Hwang J (2000) *J Biol Chem* 275: 13109-13117
50. Wu HY, Shyy SH, Wang JC, Liu LF (1988) *Cell* 53: 433-440
51. Brill SJ, Di Nardo S, Voelkel-Meiman K, Sternglanz R (1987) *Nature* 326: 414-416
52. Labourier E, Rossi F, Gallouzi IE, Allemand E, Divita G, Tazi J (1998) *Nucleic Acids Res* 26: 2955-2962
53. Rossi F, Labourier E, Gallouzi IE, Allemand E, Divita G, Tazi J (1998) *Nucleic Acids Res* 26: 2963-2970
54. Straub T, Grue P, Uhse A, Lisby M, Knudsen BR, Tange TO, Westergaard O, Boege F (1998) *J Biol Chem* 273: 26261-26264
55. Straub T, Knudsen BR, Boege F (2000) *Biochemistry* 39: 7552-7558
56. Christiansen K, Svejstrup AB, Andersen AH, Westergaard O (1993) *J Biol Chem* 268: 9690-9671
57. Hino O, Ohtake K, Rogler CE (1989) *J Virol* 63: 2638-2643
58. Wang HP, Rogler CE (1991) *J Virol* 65: 2381-2392
59. Kim RA, Wang JC (1992) *Cell* 57: 975-985
60. Wang JC, Caron PR, Kim RA (1990) *Cell* 62: 403-406
61. Cheng C, Kussie P, Pavletich N, Shuman S (1998) *Cell* 92: 841-850
62. Cao Y, Hayes F (1999) *J Mol Biol* 289: 517-527
63. Castano IB, Brzoska PM, Sadoff BU, Chen H, Christman MF (1996) *Genes Dev* 10: 2564-2576
64. Strunnikov AV, Jessberger R (1999) *Eur J Biochem* 263: 6-13
65. Castano IB, Heath-Pagliuso S, Sadoff BU, Fitzhugh DJ, Christman MF (1996) *Nucleic Acids Res* 24: 2404-2410
66. Shykind BM, Kim, J Stewart L, Champoux JJ, Sharp PA (1997) *Genes Dev* 11: 397-407
67. Romig H, Richter A (1990) *Biochim Biophys Acta* 1048: 274-280
68. Thiagarajan M, Kotani H, Holloman WK, Kmiec EB (1993) *Biochim Biophys Acta* 1173: 155-164
69. Kunze N, Yang G, Dolberg M, Sundarp R, Knippers R, Richter A (1991) *J Biol Chem* 266: 9610-9616
70. Koiwai O, Yasui Y, Sakai Y, Watanabe T, Ishii K, Yanagihara S, Andoh T (1993) *Gene* 125: 211-216
71. Baumgartner B, Heiland S, Kunze N, Richter A, Knippers R (1994) *Biochim Biophys Acta* 1218: 123-127
72. Heiland S, Knippers R, Kunze N (1993) *Eur J Biochem* 217: 813-822
73. Hwong CL, Chen MS, Hwang JL (1989) *J Biol Chem* 264: 14923-14926
74. Sobczak J, Tournier MF, Lotti AM, Duguet M (1989) *Eur J Biochem* 180: 49-53
75. Romig H, Richter A (1990) *Nucleic Acids Res* 18: 801-808
76. Desai SD, Liu LF, Vazquez-Abad D, D'Arpa P (1997) *J Biol Chem* 272: 24159-24164
77. Samejima K, Svingen PA, Basi GS, Kottke T, Mesner PW, Stewart L, Durrieu F, Poirier GG, Alnemri ES, Champoux JJ, Kaufmann SH, Earnshaw WC (1999) *J Biol Chem* 274: 4335-4340
78. Ferro AM, Higgins P, Olivera BM (1983) *J Biol Chem* 258: 6000-6003
79. Mattern MR, Mong SM, Bartus HF, Mirabelli CK, Crooke ST, Johnson RK (1987) *Cancer Res* 47: 1793-1798
80. Chatterjee S, Cheng MF, Trivedi D, Petzold SJ, Berger NA (1989) *Cancer Commun* 1: 389-394
81. D'Amours D, Desnoyers S, D'Silva I, Poirier GG (1999) *Biochem J* 342: 249-268
82. Pommier Y, Kerrigan D, Hartman KD, Glazer RI (1990) *J Biol Chem* 265: 9418-9422
83. Kaiserman HB, Ingebritsen TS, Benbow RM (1988) *Biochemistry* 27: 3216-3222
84. Samuels DS, Shimizu N (1992) *J Biol Chem* 267: 11156-11162
85. Gorsky LD, Cross SM, Morin MJ (1989) *Cancer Commun* 1: 83-92
86. Cardellini E, Durban E (1993) *Biochem J* 291: 303-307
87. Samuels DS, Shimizu Y, Nakabayashi T, Shimizu N (1994) *Biochim Biophys Acta* 1223: 77-83
88. D'Arpa P, Liu LF (1995) *Exp Cell Res* 217: 125-131
89. Kordiyak GJ, Jakes S, Ingebritsen TS, Benbow RM (1994) *Biochemistry* 33: 13484-13491
90. Duguet M (1997) *J Cell Sci* 110: 1345-1350
91. Haluska Jr P, Rubin EH (1998) *Advan Enzyme Regul* 38: 253-262
92. Gobert C, Bracco L, Rossi F, Olivier M, Tazi J, Lavelle F, Larsen AK, Riou J-F (1996) *Biochemistry* 35: 5778-5786
93. Pommier Y, Kohlhagen G, Wu C, Simmons DT (1998) *Biochemistry* 37: 3818-3823
94. Ciavarra RP, Goldman C, Wen K-K, Tedeshi B, Castora FJ (1994) *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 1751-1755
95. Javaherian K, Liu LF (1983) *Nucleic Acids Res* 11: 461-472
96. Richter A, Kapitzka M (1991) *FEBS Lett* 294: 125-128
97. Van Hope D, Gaikwad A, Yadav BS, Reddy MK, Sopory S, Mukherjee SK (1999) *Plant J* 19: 153-162
98. Tsurimoto T (1998) *Biochim Biophys Acta* 1443: 23-39
99. Duguet M, Yarranton G, Geftter ML (1978) *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol* 43: 335-343
100. Simmons DT, Melendy T, Usher D, Stillman B (1996) *Virology* 222: 365-374
101. Pham XH, Reddy MK, Ehtesham NZ, Matta B, Tuteja N (2000) *Plant J* 24: 219-229
102. Trowbridge PW, Roy R, Simmons DT (1999) *Mol Cell Biol* 19: 1686-1694
103. Tuteja R, Tuteja N (1999) *Crit Rev Biochem Mol Biol* 33: 407-436
104. Janus F, Albrechtsen N, Dornreiter I, Wiesmuller L, Grosse F, Deppert W (1999) *Cell Mol Life Sci* 55: 12-27
105. Takahashi H, Matsuda M, Kojima A, Andoh T, Kurata T, Negashima K, Hall WW (1995) *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 5691-5698
106. Haluska Jr P, Saleem A, Rasheed Z, Ahmed F, Su EW, Liu LF, Rubin EH (1999) *Nucleic Acids Res* 27: 2538-2544
107. Park H, Sternglanz R (1999) *Yeast* 15: 35-41
108. Bauer PI, Buki KG, Comstock JA, Kun E (2000) *Int J Mol Med* 5: 533-540
109. Zhao J, Benbow RM (1993) *Biochemistry* 32: 10622-10628
110. Yoshida M, Suzuki T (2000) *AIDS Res Hum Retroviruses* 16: 1639-1645



# Od zróżnicowanej ekspresji genu do klonu cDNA — przegląd metod identyfikacji genów o zmiennym poziomie transkrypcji

## From differential gene expression to cDNA clone — a review of methods for identification of genes with variable level of transcription

ANNA LINKIEWICZ<sup>1</sup>, MARCIN FILIPECKI<sup>2</sup>

### Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Metody selekcji genów o zróżnicowanej ekspresji bazujące na technikach hybrydyzacji kwasów nukleinowych
  - II-1. Hybrydyzacja różnicowa
  - II-2. Subtrakcja
  - II-3. Mikroukłady DNA
  - II-4. Supresyjna hybrydyzacja odejmująca — SSH
- III. Metody analizy genów o zróżnicowanej ekspresji oparte na technikach sekwencjonowania
  - III-1. Analiza EST
  - III-2. Seryjna analiza ekspresji genów — SAGE
- IV. Metody identyfikacji genu w oparciu o długość amplifikowanego fragmentu cDNA
  - IV-1. Szybka analiza ekspresji genów — RAGE
  - IV-2. Różnicowe profilowanie ekspresji genów — *differential display*
- V. Podsumowanie

### Contents:

- I. Introduction
- II. Methods for selection of differentially expressed genes based on nucleic acid hybridization techniques
  - II-1. Differential hybridization
  - II-2. Subtraction
  - II-3. DNA microarrays
  - II-4. Suppression Subtractive Hybridization
- III. Methods for differentially expressed genes analysis based on DNA sequencing techniques
  - III-1. EST analysis
  - III-2. Serial Analysis of Gene Expression
- IV. Methods identifying genes according to amplified cDNA fragment length
  - IV-1. Rapid Analysis of Gene Expression
  - IV-2. Differential Display
- V. Conclusions

Wykaz stosowanych skrótów: pz — par zasad, EST — sekwencyjne znaczniki ekspresji (ang. *Expressed Sequence Tags*), DD — różnicowe profilowanie ekspresji genów (ang. *Differential Display*), RAGE — szybka analiza ekspresji genów (ang. *Rapid Analysis of Gene Expression*), SAGE — seryjna analiza ekspresji genów (ang. *Serial Analysis of Gene Expression*), SSH — supresyjna hybrydyzacja odejmująca (ang. *Suppression Subtractive Hybridization*), mRNA — informacyjny RNA, cDNA — komplementarny DNA

### I. Wstęp

Spośród szacowanych 30.000-35.000 genów człowieka [1] tylko około 10-20% jest wyrażane w konkretnej komórce. Ten niewielki zestaw odpowiada za właściwości danej komórki, kontrolę jej wewnętrznych procesów, jak również za kontakty ze środowiskiem zewnętrznym. Jedną z bardziej interesujących zagadek biologii jest to, jak dziesiątki tysięcy genów ulegają selektywnej ekspresji, podlegając czasowej i przestrzennej regulacji. Zmiany w ekspresji genów mogą prowadzić do zaburzeń w funkcjonowaniu komórki czy w końcu do patologii. Jednym z pierwszych etapów, które pozwalają zrozumieć procesy zachodzące w komórce jest wykrycie różnic w ilości określonego typu mRNA w porównywanych próbach, idąca za tym izolacja i charakterystyka ge-

<sup>1</sup>Dr, <sup>2</sup>dr, Katedra Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin SGGW, ul. Nowoursynowska 166, 02-787 Warszawa; tel. 843-90-61 w.113-39; linkiewicz@alpha.sggw.waw.pl.; filipecki@alpha.sggw.waw.pl

nów o zróżnicowanej ekspresji. Niniejszy przegląd obejmuje wybrane klasyczne i bardziej nowoczesne metody umożliwiające dostrzeżenie różnic w ekspresji genów na poziomie transkrypcyjnym. Szczególną uwagę poświęcono metodzie różnicowego profilowania ekspresji genów (ang. *differential display*), ze względu na doświadczenia autorów w zastosowaniu tej analizy ekspresji genów.

Geny o zróżnicowanej ekspresji identyfikowano do niedawna głównie przy użyciu hybrydyzacji różnicowej lub subtraktywnej, a także na podstawie obrazu rozdziału w żelach ich białkowych produktów. Od kiedy możliwe jest korzystanie z bogatych baz danych sekwencji kwasów nukleinowych oraz białek, liczba genów, których ekspresję możemy śledzić stała się za duża dla tradycyjnych analiz. Idealna metoda powinna umożliwić jednoczesną ocenę wszystkich genów uaktywniających się w komórce i pokazywać zmiany w obrazie ich ekspresji w trakcie interesujących nas procesów. Rozważając wybór strategii, jaką użyjemy do wykrycia genów o zróżnicowanym poziomie ekspresji, musimy brać pod uwagę: (1) liczbę próbek, które chcemy jednocześnie porównywać, (2) jakie mogą być różnice w ilości danego transkryptu w porównywanych próbkach, (3) możliwość wykrycia genów indukowanych, jak również ulegających represji, (4) ograniczenia mogące wynikać z niewielkiej ilości posiadanego RNA, (5) czułość metody, (6) skalę przeglądu ekspresji jaką umożliwi nam dana metoda.

## II. Metody selekcji genów o zróżnicowanej ekspresji bazujące na technikach hybrydyzacji kwasów nukleinowych:

### II-1. Hybrydyzacja różnicowa

Podstawą wielu metod porównywania *in vitro* prób RNA i znajdowania genów o zróżnicowanym poziomie ekspresji jest hybrydyzacja różnicowa [2], gdzie poli(A)<sup>+</sup>RNA izolowany z dwóch badanych typów komórek stanowi matrycę do syntezy znakowanych radioaktywnie sond cDNA. Sondy te są hybrydyzowane do biblioteki cDNA, najczęściej naniesionej na dwie kopie nylonowych lub nitrocelulozowych filtrów. Klony, które hybrydują z dwoma sondami, odpowiadają genom ulegającym ekspresji w obu typach komórek. Klony ujawniające się lub dające wyraźniejszy sygnał po hybrydyzacji z jedną z sond, odpowiadają potencjalnym genom o zróżnicowanej ekspresji. W założeniu metoda ta miała umożliwić wykrycie wszystkich transkryptów w komórce. Jednak ze względu na ograniczenia wyni-

kające z czułości hybrydyzacji różnicowej, detekcja genów o zróżnicowanym poziomie ekspresji jest możliwa dopiero, gdy dane mRNA stanowi przynajmniej 0,05-0,1% całkowitego mRNA w badanej komórce. Podstawowymi zaletami tej metody są stosunkowo mała pracochłonność i wysokie prawdopodobieństwo otrzymania powtarzalnych wyników. Przy wykorzystaniu hybrydyzacji różnicowej wykryto już wiele genów ulegających zróżnicowanej ekspresji, wśród których wymienić można geny istotne dla rozwoju zarodkowego muszki owocowej [3] i determinacji rozwojowej blastomerów zarodka żaby szponiastej [4]. Na efektywność metody wpływa rodzaj wykorzystywanej biblioteki cDNA. W przypadku biblioteki nieznormalizowanej, czyli takiej która nie zawiera proporcjonalnej liczby klonów cDNA dla każdego genu, istnieje duża szansa sklonowania wyłącznie transkryptów wysokokopijnych. Normalizacja biblioteki cDNA pozwala na kilkukrotne zwiększenie proporcji klonów cDNA reprezentujących najrzadsze rodzaje mRNA.

### II-2. Subtrakcja

Udoskonaleniem, zwiększającym około dziesięciokrotnie czułość metody hybrydyzacji różnicowej, było zastosowanie techniki subtrakcji (hybrydyzacji odejmującej). Technika ta polega na hybrydyzacji jednoniciowego cDNA z próbki eksperymentalnej do nadmiaru mRNA pochodzącego z próbki kontrolnej, co prowadzi do powstania trzech rodzajów cząsteczek: hybrydy RNA/DNA, niesparowane cząsteczki jednoniciowego cDNA i nadmiar mRNA. Sekwencje jednoniciowego cDNA, które podczas hybrydyzacji nie znalazły komplementarnej nici mRNA, mogą być następnie użyte do syntezy specyficznych sond czy konstrukcji biblioteki subtrahowanej. W uzyskanej w ten sposób kolekcji fragmentów cDNA ograniczona znacznie jest liczba sekwencji odpowiadających genom, których poziom ekspresji w badanych próbkach jest zbliżony. Szczególnie te rodzaje mRNA, które stanowią bardzo liczną grupę, jak geny kodujące białka metabolizmu podstawowego i szkieletu komórkowego, wyłączone są z analizy. Subtrakcja cDNA pozwala na otrzymanie zestawu klonów reprezentujących mRNA, które występuje w komórce w niewielkiej liczbie kopii i jest często najbardziej interesujące pod względem różnic w poziomie ekspresji. Nadal jednak poszukiwanie tą metodą transkryptów, które ujawniają się na bardzo niskim poziomie (mniej niż 0,005% całkowitego mRNA) stanowi problem. Dlatego do metod konstruowania bibliotek subtrahowanych wprowadzono wiele udoskonaleń,

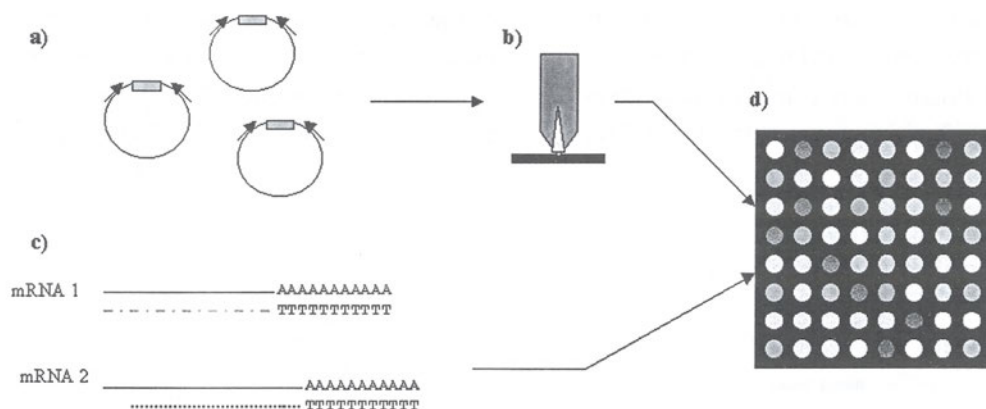
jak zastosowanie starterów oligo-dT przyłączonych do podłoża stałych, co upraszcza odizolowanie hybrid RNA/DNA [5] i włączenie reakcji PCR do zwiększenia liczby kopii cDNA po subtrakcji [6, 7].

### II-3. Mikroukłady DNA

Jednym z nowocześniejszych podejść do analizy zróżnicowanej ekspresji genów opartym na technikach hybrydyzacji są mikroukłady DNA. Metoda ta polega na hybrydyzacji sondy reprezentującej pulę transkryptów do zbioru wielu próbek DNA przyłączonych do stałego nośnika [8]. Mikroukłady budowane są przy wykorzystaniu sekwencji cDNA np. EST, produktów PCR lub fragmentów sklonowanego DNA przyłączanych do powierzchni matrycy (ang. *DNA microarrays*). Inną możliwością jest synteza *in situ* oligonukleotydów specyficznych genowo, nanoszonych bezpośrednio na powierzchnię nośnika w procesie fotolitografii (ang. *oligonucleotide arrays*) [9, 10, 11]. Nośnikiem najczęściej jest szkło, ale w przypadku mniejszych eksperymentów mogą być stosowane również nylon, nitroceluloza lub silikon [12]. Badane cDNA, znakowane radioaktywnie lub przy użyciu fluorochromów, jest hybrydyzowane w nadmiarze do układów zawierających DNA klonów (Ryc. 1). Ilość sondy hybrydującej do określonego DNA może być mierzona i przeliczana na

DNA można przeanalizować ekspresję 10 000 i więcej genów [13]. Mikroukłady dla wyższych eukariontów są zazwyczaj konstruowane na bazie EST, dla drożdży i prokariotów wykorzystuje się DNA genomowe amplifikowane przy użyciu starterów specyficznych dla określonych genów [14, 15].

Istotnym czynnikiem, decydującym o skuteczności mikroukładów DNA w wykrywaniu zróżnicowanej ekspresji genów, jest jakość RNA poddawanej odwrotnej transkrypcji, a następnie znakowaniu fluorescencyjnemu. Zanieczyszczenia (białka komórkowe, lipidy) mogą powodować niespecyficzne wiązanie znakowanego cDNA do powierzchni płytki. Czynnikiem ograniczającym wykorzystanie tej metody może być też stosunkowo duża ilość RNA konieczna do przeprowadzenia hybrydyzacji. Aby uzyskać wyraźny sygnał fluorescencyjny, konieczne jest 50-200 µg całkowitego RNA (2-5 µg mRNA) na pojedynczą hybrydyzację na mikronośniku [14]. Istotny wydaje się również dość wysoki koszt analizy, nie tyle ze względu na koszt samego mikroukładu, co raczej na konieczność kupna specjalistycznego sprzętu (robot nanoszący próbki, jeśli budujemy własny mikroukład, czytnik laserowy, oprogramowanie) [15]. Niewątpliwą zaletą metody jest uzyskanie ilościowej informacji na temat poziomu ekspresji dużej liczby (setek czy tysięcy) genów jednocześnie. Plusem jest też możliwość natychmiasto-



**Ryc. 1.** Schemat analizy zróżnicowanej ekspresji genów przy użyciu mikroukładów DNA (za [14] — zmienione); Sekwencje DNA badanych genów są amplifikowane PCR (a) i nanoszone przez robot na powierzchnię szklanej płytki w ściśle określonej pozycji (b). Najczęściej około 10 000 fragmentów DNA jest nanoszone na powierzchnię 3,24 cm<sup>2</sup>. mRNA pochodzące z dwóch badanych prób jest poddawane odwrotnej transkrypcji a powstające rodzaje cDNA znakuje się używając nukleotydów z różnymi barwnikami fluorescencyjnymi (c). Po zmieszaniu sondy hybrydyzowane są do mikroukładu DNA. Sygnał fluorescencyjny związany z każdym elementem na mikroukładzie, dzięki wzbudzeniu laserowemu odczytywany jest przez skaner połączony z mikroskopem konfokalnym (d). Monochromatyczny obraz ze skanera jest importowany do komputera, gdzie przy użyciu odpowiedniego oprogramowania wykonywana jest ilościowa ocena sygnału po hybrydyzacji.

częstość występowania danego mRNA w badanej próbce. Jeśli do znakowania cDNA użyjemy różnych rodzajów fluorochromów, możliwe staje się jednocześnie poznanie profili ekspresji w dwóch lub większej liczbie prób. Na pojedynczym mikroukładzie

wej interpretacji wyników uzyskanych po hybrydyzacji oraz otrzymanie informacji, mówiącej jak wzór ekspresji jednego genu pozostaje w relacji do wzoru ekspresji innych genów. Inną zaletą badania zróżnicowanej ekspresji genów przy użyciu mikro-

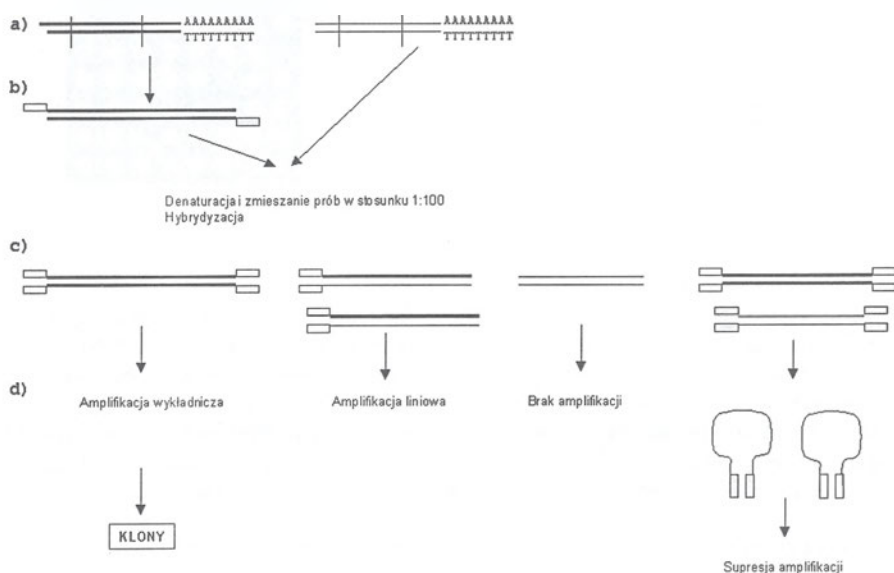


układów DNA jest wysoka czułość analiz. Podaje się, że przy wykorzystaniu mikroukładów DNA można wykryć transkrypty występujące w liczbie jednej kopii na 100000 cząsteczek [16]. Za wyborem tego typu oceny zróżnicowanej ekspresji genów stoją również szybkość analizy, mała pracochłonność oraz zautomatyzowanie obróbki danych. Przede wszystkim jednak uzyskuje się nieporównywalną z innymi metodami ilość informacji na temat ekspresji genów na poziomie transkryptu. Nagromadzenie uzyskanych dzięki użyciu mikroukładów danych osiągnęło poziom, przy którym możliwe staje się mówienie o funkcjonalnej klasyfikacji genów. Coraz istotniejsze wydaje się opracowanie statystycznych metod umożliwiających taką klasyfikację. Pozwoli to na udzielenie odpowiedzi na pytanie: jakie geny ulegają równoległej ekspresji (koekspresji) z badanym zestawem genów [17, 18]?

#### II-4. Supresyjna hybrydyzacja odejmująca — SSH

Kolejna metoda służąca do wykrywania genów o zróżnicowanej ekspresji, która wykorzystuje hybrydyzację jak też reakcję PCR, określana jest nazwą supresyjna hybrydyzacja odejmująca (ang. *Suppression Subtractive Hybridization* — SSH). Pierwotnie jej zasadę wykorzystano w metodzie RDA (ang. *Representational Difference Analysis*), służącej do identyfikacji różnic pomiędzy dwoma genomami [19, 20]. Schemat działania metody supresyjnej hybrydyzacji odejmującej przedstawiono na rycinie 2. W pierwszym etapie mRNA pochodzące z dwóch porównywanych źródeł: tkanki badanej (ang. *tester*), w której

spodziewamy się ekspresji poszukiwanych genów oraz z kontroli (ang. *driver*), czyli tkanki w której interesujące nas geny nie powinny ulegać ekspresji, poddawane są reakcji odwrotnej transkrypcji. Po połączeniu cDNA enzymem restrykcyjnym rozpoznającym czteronukleotydowe sekwencje, do końców fragmentów cDNA próby badanej przyłączane są dwa typy oligonukleotydowych adaptorów. Ma to na celu zapewnienie amplifikacji PCR przy użyciu starterów specyficznych do sekwencji adaptorów. Następnie zdenaturowane cDNA próby badanej i kontrolnej jest mieszane w stosunku 1:100. Umożliwia to hybrydyzację między jednoniciowymi cDNA, typowymi dla obu grup. Następujący później PCR, amplifikuje w sposób wykładniczy tylko te homoduplexy, które powstały z cDNA próby badanej, ponieważ tylko one mają miejsce przyłączenia startera na dwóch końcach dwuniciowej struktury. Podstawową zaletą opisywanej metody jest preferencyjna amplifikacja fragmentów obecnych wyłącznie w cDNA próby badanej. Dodatkową korzyścią jest wzbogacenie cDNA próby badanej w rzadkie sekwencje. Ma to miejsce ze względu na efekt supresji PCR podczas amplifikacji [21]. Efekt ten powoduje, że fragmenty pochodzące od często występującego mRNA, które zawierają komplementarne odcinki sekwencji na końcach jednoniciowego cDNA (odcinki te pochodzą od adaptorów tego samego typu) hybrydują ze sobą tworząc struktury drugorzędowe nie ulegające amplifikacji (patrz Ryc. 2d.). Proces ten zachodzi z większym prawdopodobieństwem niż przyłączanie krótszego od adaptoru startera, co wynika z kinetyki reakcji hybrydyzacji. Prowadzi to do



Ryc. 2. Zasada działania metody SSH (na podstawie [45] — zmodyfikowane); a) odwrotna transkrypcja mRNA tkanek badanej i kontrolnej, cięcie cDNA; b) ligacja adaptorów do cDNA tkanki badanej, c) hybrydyzacja cDNA próby badanej i kontrolnej; d) amplifikacja PCR przy wykorzystaniu sekwencji adaptorów; szczegóły w tekście.

wyrównania częstości występowania różnych typów mRNA w badanej próbie. W przeciwieństwie do metod, które prowadzą do amplifikacji fragmentów pochodzących z wszystkich cząsteczek RNA matrycowego, supresyjna hybrydyzacja odejmująca znacznie ogranicza występowanie mRNA obecnego w obu badanych próbach. Do analizy pozostawione są głównie te fragmenty cDNA, które różnią badane pule. W przypadku opisywanej metody istotna jest również możliwość dodania do próby kontrolnej sekwencji genów, których nie chcemy zidentyfikować. Tym samym automatycznie wykluczamy je z analiz. Wadami metody SSH są: (1) niezdolność do porównania więcej niż dwóch próbek jednocześnie, (2) brak możliwości równoległej detekcji transkryptów o podwyższonej i obniżonej ekspresji oraz (3) śledzenia zmian ilościowych w poziomie transkryptu na poszczególnych etapach badanego procesu. Pomimo tych wad, metoda supresyjnej hybrydyzacji odejmującej pozwoliła na identyfikację wielu genów, między innymi wykazujących zróżnicowaną ekspresję przy porównaniu komórek normalnych i nowotworowych [19, 22, 23], a także na izolację klonów cDNA zaangażowanych w rozwój kwiatów goździka [24].

### III. Metody analizy genów o zróżnicowanej ekspresji oparte na technikach sekwencjonowania

#### III-1. Analiza EST

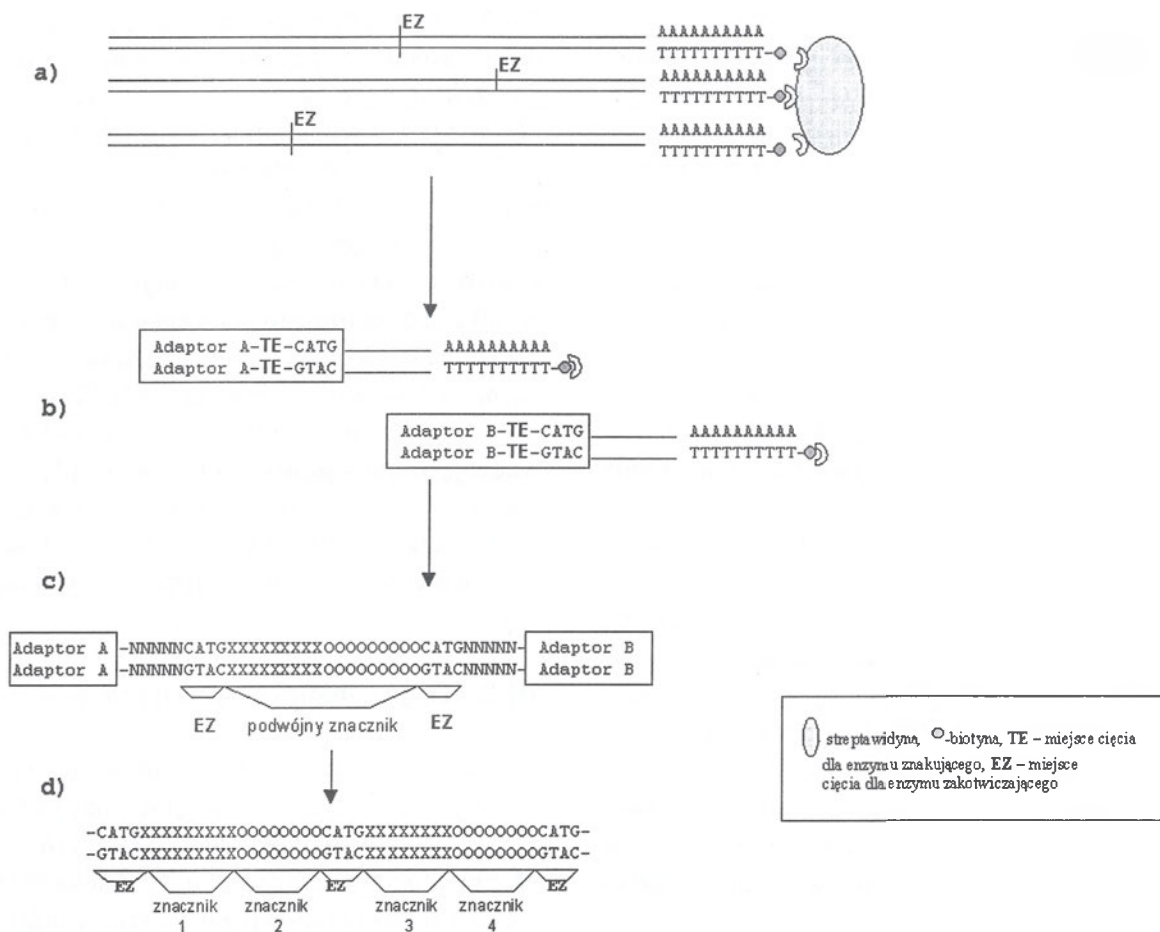
Do wykrywania różnic w ekspresji genów na poziomie transkryptu służą również metody wykorzystujące sekwencjonowanie DNA. Jedną z nich jest analiza sekwencyjnych znaczników ekspresji (ang. *Expressed Sequence Tags* — EST) [25]. W metodzie tej częściowe sekwencje cDNA, określane skrótem EST, stanowią identyfikatory sekwencji transkrybowanych, czyli wykazują bezpośredni związek z ekspresją określonych genów. W celu charakterystyki sekwencji kodujących mRNA zaproponowano gromadzenie i sekwencjonowanie losowo wybranych fragmentów cDNA pochodzących z różnych źródeł. Takie podejście spowodowało szybkie wypełnienie baz danych informacjami na temat obrazu ekspresji genów u wielu badanych obiektów. Uzyskane w ten sposób krótkie sekwencje (200-500 pz) ujawniają jedynie część informacji zawartej w genie. Nakładające się sekwencje EST mogą być łączone w całość, co umożliwia poznanie dłuższego odcinka kodującego w genie. Kolekcje sekwencji EST można też wykorzystywać do konstruowania mikroukładów

DNA. Analiza EST jest łatwą, taną i szybką metodą oceny zróżnicowanej ekspresji genów. Wymaga jednak zakrojonego na szeroką skalę sekwencjonowania, co nie zawsze jest możliwe w laboratoriach średniej wielkości. Podstawowe problemy powstające podczas wykorzystania analizy EST do oceny zróżnicowanej ekspresji genów na poziomie transkrypcyjnym to: (1) jakość sekwencji (EST powstają w wyniku jednokrotnego sekwencjonowania pojedynczej nici cDNA, co powoduje, że ilość błędów w uzyskanej sekwencji może sięgać 5% [26]); (2) pozostałości sekwencji nukleotydowych wektora wprowadzające niepoprawną informację; (3) niewystarczająca informacja na temat rzadko występujących klonów cDNA, gdyż zbyt wiele EST pochodzi od genów podlegających transkrypcji na wysokim poziomie.

#### III-2. Seryjna analiza ekspresji genów — SAGE

Nie zawsze informacja o transkrypcie pochodzi z analizy sekwencyjnej względnie dużego fragmentu cDNA. Kolejną metodą identyfikacji zróżnicowanej ekspresji genów w oparciu o dane sekwencyjne jest seryjna analiza ekspresji genów (ang. *Serial Analysis of Gene Expression* — SAGE) [27], która pozwala uzyskać informacje o transkryptach, dzięki identyfikacji krótkich, 10-14 nukleotydowych fragmentów. Metoda ta składa się z trzech etapów. Pierwszy obejmuje produkcję znaczników sekwencyjnych, czyli krótkich odcinków, dzięki którym można jednoznacznie zidentyfikować poszczególne transkrypty. W drugim etapie ma miejsce ligacja tych fragmentów w oligomery, złożone z około 20-35 znaczników, które następnie będą klonowane i sekwencjonowane. Etap trzeci to identyfikacja poszczególnych typów znaczników i określenie częstości ich występowania w badanych układach.

Aby mogły powstać znaczniki sekwencyjne, mRNA poddawane jest odwrotnej transkrypcji. Powstałe cDNA jest cięte enzymem restrykcyjnym rozpoznającym czteronukleotydowe sekwencje (tzw. enzym zakotwiczący — EZ), tak dobranym, by z dużym prawdopodobieństwem przeciął każdą cząsteczkę (Ryc. 3). Następnie cDNA jest dzielone na dwie pule i do każdej z nich przyłączany jest inny typ adaptoru (adaptor A lub B). Adaptory A i B zawierają miejsce restrykcyjne dla enzymu klasy IIS (TE — enzym znakujący), który tnie DNA w zdefiniowanej odległości od rozpoznawalnej sekwencji (do 20 pz). Cięcie enzymem TE daje 10-14 nukleotydowe fragmenty sekwencji cDNA (znaczniki sekwencyjne) z dołączonymi adaptorami. Fragmenty



**Ryc. 3.** Schemat metody SAGE (za [34] — zmodyfikowane); a) - Cięcie enzymem zakotwiczącym EZ, oddzielenie fragmentów cDNA dzięki oddziaływaniu biotyna — streptawidyna, podział próby na 2 pule i ligacja do 2 typów adaptorów — A i B; b) Cięcie enzymem klasy IIS — TE, Ligacja znaczników sekwencyjnych i amplifikacja przy użyciu starterów A i B; c) Cięcie enzymem zakotwiczącym EZ; d) ligacja znaczników w oligomery, wstawienie do wektora i sekwencjonowanie znaczników; szczegółowy opis w tekście.

te, po sklejeniu w pary (cDNA po środku, adaptory na końcach) są amplifikowane przy użyciu starterów A i B. Po powieleniu miejsca przyłączenia starterów są usuwane, do czego służy enzym zakotwiczący (EZ). Następująca potem ligacja umożliwi powstanie oligomerów składających się z 20-35 znaczników sekwencyjnych, które mogą być ligowane z wektorem plazmidowym. Struktura takich oligomerów ma układ umożliwiający łatwą identyfikację poszczególnych znaczników po sekwencjonowaniu. Pomiędzy miejscami restrykcyjnymi dla enzymu zakotwiczącego znajduje się podwójny znacznik, czyli „zlepek” dwóch sekwencji. Ostatni etap to analiza częstości występowania danych znaczników w każdym z badanych układów. Na tej podstawie wnioskujemy o poziomie ekspresji konkretnych genów. Potwierdzeniem skuteczności metody SAGE była korelacja uzyskanych wyników z częstością występowania odpowiednich klonów w bibliotekach cDNA [27]. Można jednak zadać pytanie, czy informacja zawarta w tak krótkich sekwencjach (10-14 pz) pozwala na precyzyjną identyfikację unikalnych transkryptów? Teoretycznie dziewięcionu-

kleotydowy odcinek sekwencji występuje w  $4^9$ , czyli 262.144 kombinacjach sekwencji tzn. może odróżnić zbliżoną ilość różnych transkryptów. Jest to więc wystarczająco długa sekwencja aby określić każdy transkrypt występujący np. w ludzkich komórkach, gdzie ekspresji może ulec kilkadziesiąt tysięcy różnych genów [27]. Seryjna analiza ekspresji genów pozwala w zasadzie na przebadanie w ramach jednego eksperymentu wszystkich transkryptów obecnych na terenie komórki. Dzięki niej otrzymujemy ilościowe informacje tak na temat znanych, jak też jeszcze nie opisanych genów. Metodę tę wykorzystano do wykrycia indukowanej ekspresji genu *p53* poprzedzającej apoptozę i do analizy profili ekspresji pomiędzy normalnymi a nowotworowymi komórkami [28, 29]. W przypadku, gdy możliwe jest wykorzystanie automatycznego sekwenatora i komputerowej analizy danych, opisana metoda pozwala na szybkie poznanie profili ekspresji genów, których odpowiedniki znajdują się w dostępnych bazach danych. Niewątpliwą wadą SAGE jest możliwość identyfikacji genów głównie dzięki sekwencjom dostępnym w bazach danych. Ogranicza to stosowanie metody do



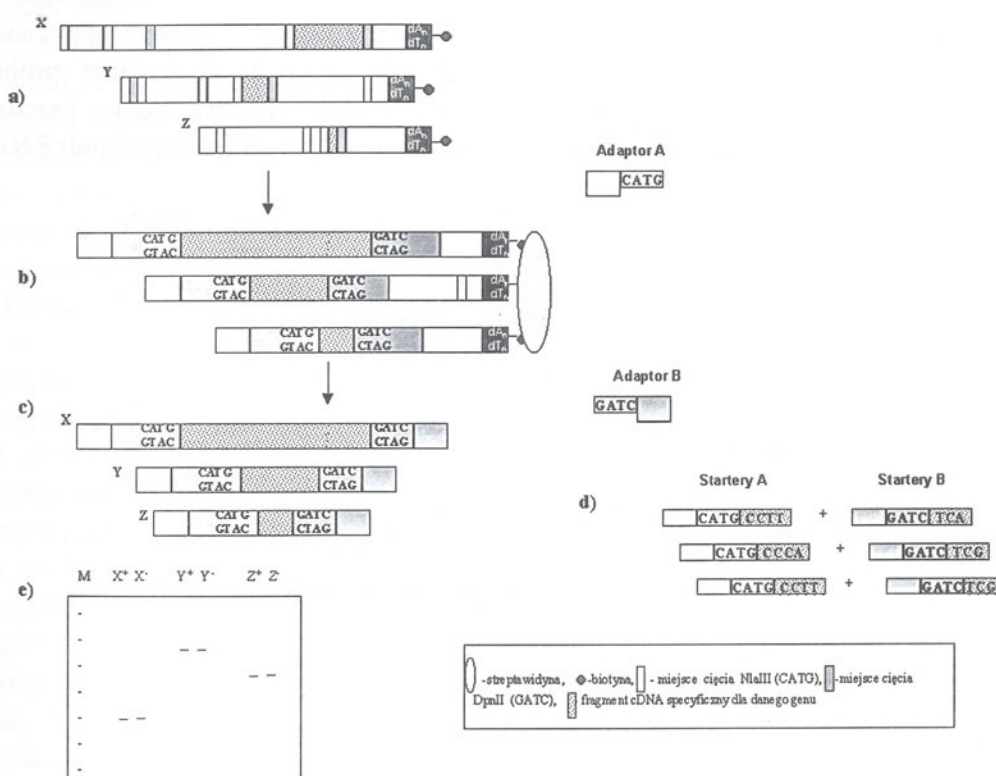
organizmów modelowych, dla których opisano wiele genów. Istnieje jednak sposób na przełamanie tego ograniczenia poprzez wykorzystanie interesujących znaczników sekwencyjnych jako sond oligonukleotydowych do przeglądania konwencjonalnej biblioteki i identyfikacji cDNA pełnej długości.

#### IV. Metody identyfikacji genu w oparciu o długość fragmentu cDNA po RT-PCR

##### IV-1. Szybka analiza ekspresji genów — RAGE

Modyfikacją seryjnej analizy ekspresji genów, umożliwiającą jednoczesne poznanie wielu genów o zróżnicowanej ekspresji bez konieczności sekwencjonowania jest metoda szybkiej analizy ekspresji genów (ang. *Rapid Analysis of Gene Expression* —

matrycy. Informacja o zróżnicowanej ekspresji genów w badanych układach pochodzi z porównania na żelach poliakryloamidowych intensywności prążków odpowiadających konkretnym produktom. Do przygotowania matryc poddawanych amplifikacji wykorzystuje się fragmenty cząsteczek cDNA reprezentujące określone geny (ang. *gene specific targets*). Fragmenty te powstają przez odwrotną transkrypcję mRNA i cięcie cDNA enzymami rozpoznającymi czteronukleotydowe sekwencje (np. *DpnII*, *NlaIII*) (Ryc. 4). Po cięciu enzymem *NlaIII* następuje selekcja fragmentów cDNA zakończonych odcinkiem oligo(dA), a zarazem z miejscem restrykcyjnym dla drugiego enzymu (*DpnII*). Uzyskane fragmenty są izolowane dzięki reszcie biotyny przyłączonej kowalencyjnie do cDNA i kulkom pokrytym streptawidyną, które wiążą biotynę. Do wol-



**Ryc. 4.** Zasada działania metody RAGE (na podstawie [30] — zmodyfikowane); a) cząsteczki cDNA z fragmentami specyficznymi dla genów X, Y i Z znajdują się pomiędzy sekwencją rozpoznawaną przez enzym *NlaIII* a sekwencją cięcia dla enzymu *DpnII* najbliższą końcowi 3' transkryptu; b) cięcie enzymem *NlaIII* umożliwia selekcję oligo(dA) fragmentów i ich izolację dzięki oddziaływaniu biotyna - streptawidyna, do wolnego końca cząsteczki ligowany jest pierwszy adaptor — A; c) po przecięciu cząsteczek cDNA enzymem *DpnII* do nowo uwolnionego końca ligowany jest drugi adaptor — B; d) amplifikacja PCR z zestawami starterów A i B; e) rozdziel produktów amplifikacji na żelu poliakryloamidowym połączony z oceną ich ilości w badanych próbach; X<sup>+</sup> — ekspresja genu X w tkance zmienionej i X<sup>-</sup> w kontroli, M — marker mas, szczegóły metody w tekście.

RAGE) [30]. Podstawowa strategia metody polega na wykorzystaniu do reakcji PCR fragmentów cDNA — pochodnych genów z dwóch badanych prób np. komórek dzikich i transgeniczných. PCR przebiega w warunkach zapewniających amplifikację wszystkich fragmentów cDNA i umożliwia uzyskanie produktu w ilościach proporcjonalnych do koncentracji

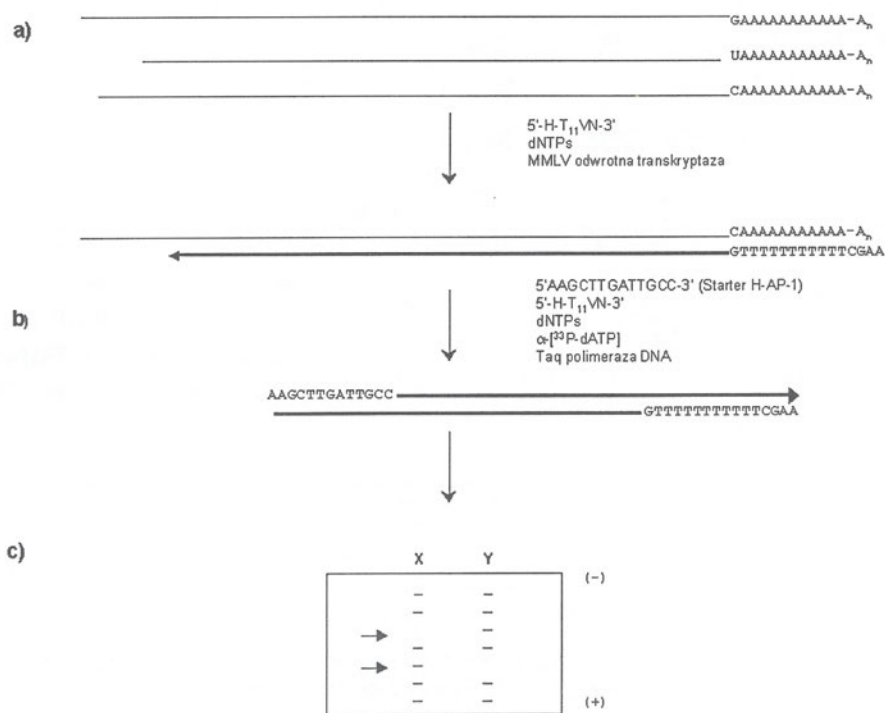
nego końca cząsteczek (po cięciu *NlaIII*) ligowany jest adaptor A. Następnie przeprowadza się cięcie fragmentów cDNA drugim enzymem restrykcyjnym (*DpnII*) i do nowo uwolnionego końca ligowany jest adaptor B. Adaptory zawierają sekwencje będące miejscami przyłączenia starterów A i B. Do reakcji amplifikacji wykorzystywane są dwa zestawy starte-

rów: startery A zawierają sekwencje adaptora A, dalej sekwencję rozpoznawaną przez enzym *Nla*III i na końcu 3' czteronukleotydy odcinek odpowiedzialny za specyficzność działania startera. W tym rejonie cztery możliwe zasady ułożone są w dowolny sposób, dający w efekcie 256 możliwych kombinacji, a przez to 256 rodzajów starterów A. Startery B zbudowane są na podobnej zasadzie, przy czym zawierają sekwencje rozpoznawane przez enzym *Dpn*II, a na końcu 3' mają trójnukleotydy region odpowiedzialny za specyficzność działania startera. W efekcie możliwe jest zastosowanie 64 rodzajów starterów B. Amplifikacja PCR przebiega w warunkach, w których każdy fragment cDNA mający na końcach sekwencje adaptorów A i B ma możliwość powielenia, a ilość produktu jest proporcjonalna do stężenia matrycy. Produkty amplifikacji rozdzielane są na żelu poliakryloamidowym, gdzie przy równoczesnym testowaniu kilku prób możliwa jest porównawcza ocena ilości produktów PCR w badanych próbach. Na podstawie takiego porównania wnioskujemy na temat poziomu różnic w ekspresji anali-

tów cDNA. Do zalet metody można zaliczyć: (1) jednolite warunki PCR pozwalające na jednoczesną analizę wielu genów lub ekspresji danego genu w różnym czasie, (2) otrzymanie jednego znacznika RAGE odpowiadającego jednej cząsteczce cDNA, co daje możliwość ilościowej oceny danych oraz ułatwia porównanie na żelach, (3) niezależność metody od danych pochodzących z hybrydyzacji [30].

#### IV-2. Różnicowe profilowanie ekspresji genów — *differential display*

W 1992r. zaproponowano alternatywną metodę do przeglądania różnicowego, pod nazwą różnicowe profilowanie ekspresji genów (ang. *Differential Display* — DD) [31]. W tej metodzie do oceny zróżnicowanej ekspresji genów wykorzystuje się reakcję RT-PCR, dzięki której otrzymuje się tysiące rodzajów cDNA, z których każdy jest pochodną genu ulegającego ekspresji w badanej próbce (Ryc. 5). Główne etapy metody można przedstawić następująco: (1) Z porównywanych puli RNA, dzięki uży-



Ryc. 5. Schemat metody *differential display* (na podstawie [31] — zmodyfikowane); a) odwrotna transkrypcja; b) amplifikacja PCR; c) rozdział produktów amplifikacji w żelu poliakryloamidowym, strzałkami zaznaczono różnicujące prążki; opis metody w tekście.

zowanych genów. Zgodnie z zamierzeniem autorów, metoda RAGE znajduje przede wszystkim zastosowanie w analizie zróżnicowanej ekspresji genów o znanej sekwencji (bazy danych sekwencji umożliwiają wybór starterów), co nie wyklucza jednak potencjalnej możliwości wykrycia nowych fragmen-

ci różnych zestawów starterów, otrzymywane są podgrupy fragmentów cDNA (ang. *subsets*). (2) Analogiczne podgrupy otrzymywane z porównywanych prób RNA są rozdzielane obok siebie na żelu poliakryloamidowym. W wyniku takiego rozdziału otrzymujemy wzory prążków określane jako odciski palca

(ang. *fingerprint*). (3) Fragmenty definiowane w oparciu o długość, a obecne tylko w jednej próbce (lub też obecne w znacznie większej ilości w jednej niż w drugiej próbce), są wycinane z żelu i poddawane dalszej obróbce. Te fragmenty są pochodnymi genów o zróżnicowanej ekspresji. W klasycznej wersji metody [31, 32], całkowite RNA wolne od DNA jest dzielone na trzy pule i każda z nich poddawana jest odwrotnej transkrypcji przy wykorzystaniu jednego z trzech starterów zakotwiczących o sekwencji  $T_{11}VN$  ( $V=A,C,G$ ;  $N=A,C,G,T$ ). Daje to matryce do następującej w dalszej kolejności reakcji PCR (Ryc. 5). Do reakcji PCR dodaje się znakowany, najczęściej radioaktywnie nukleotyd, określony starter zakotwiczący  $T_{11}VN$  i dziesięcionukleotydowy starter (starter arbitralny), który ze względu na losowo dobraną sekwencję nukleotydów, wiąże się w różnej odległości od miejsca przyłączenia startera zakotwiczącego. Warunki reakcji umożliwiają niepełną hybrydyzację startera arbitralnego z matrycą. Każda kombinacja starterów pozwoli więc na amplifikację części z ogólnego zbioru fragmentów cDNA, co daje w efekcie od 50 do 100 rodzajów fragmentów cDNA w jednej próbce. Próbką uzyskana w wyniku reakcji PCR jest rozdzielana na żelach denaturujących i wykrywana autoradiograficznie. Powstały w ten sposób wzór prążków reprezentuje profil ekspresji dla około 50 do 100 klonów cDNA. Porównanie profili ekspresji dla badanych prób pozwala zidentyfikować cDNA pochodzące od genu o zróżnicowanej ekspresji, odzyskanie go z żelu, amplifikację, klonowanie i sekwencjonowanie.

Różnicowe profilowanie ekspresji genów przedstawiono w oryginalnych publikacjach jako szybki i precyzyjny sposób porównywania profili ekspresji genów pomiędzy dwiema lub większą liczbą tkanek, rodzajów komórek, stanów metabolicznych. Była to pierwsza metoda oceny ekspresji genów na poziomie transkryptu, możliwa do wykonania "w jednej próbce" (ang. „*one-tube method*”), która pozwoliła na usystematyzowaną analizę zmian.

W wielu doniesieniach dotyczących różnicowego profilowania ekspresji genów podkreśla się ważne elementy, bez których niemożliwa jest poprawna i skuteczna analiza [33, 16, 34]. Istotny jest właściwy wybór materiału do badań. Próbkę, które będą badane, powinno charakteryzować jednorodne tło genetyczne a różnice mają dotyczyć wyłącznie badanej cechy. Jeśli analiza dotyczyłaby prób zbyt różniących się od siebie, np. świeżo izolowana tkanka i ustabilizowana linia komórkowa, wiele genów o potencjalnie zróżnicowanej ekspresji mogłoby zostać wykrytych. Większość z nich stanowiłaby odzwier-

sciedlenie różnorodności genetycznej prób a zarazem „zamaskowanie” badanego procesu.

W klasycznej metodzie różnicowego profilowania ekspresji genów temperatura przyłączania startera arbitralnego do cDNA jest celowo stosunkowo niska ( $40^{\circ}\text{C}$ ). W efekcie obniża to specyficzność wiązania startera z matrycą i powoduje oprócz zwiększenia liczby miejsc rozpoznawanych, zróżnicowanie w intensywności produktów amplifikacji na żelu poliakrylamidowym, co nie odzwierciedla rzeczywistych różnic w ekspresji genów. Ten problem może być zredukowany przez modyfikację starterów arbitralnego i zakotwiczącego [35] i zmiany profilu amplifikacji podwyższające temperaturę przyłączania starterów od piątego cyklu do  $60^{\circ}\text{C}$  [36, 37]. Kolejny problem pojawia się podczas klonowania fragmentów wykazujących zróżnicowanie. Pomimo precyzyjnego wycięcia z żelu prążka pochodzącego od mRNA różnicującego badane próby, zazwyczaj mamy do czynienia z niejednorodną grupą fragmentów podczas reamplifikacji i klonowania. Często kilka rodzajów cDNA o identycznej długości wchodzi w skład izolowanego prążka i konieczna jest dodatkowa analiza, która potwierdzi obecność właściwego klonu wykazującego zróżnicowaną ekspresję [16]. Zaleca się przeprowadzenie zarówno wewnętrznej kontroli reakcji przez zastosowanie różnych stężeń RNA matrycowego, czy prób RNA izolowanego w różnym czasie, jak i potwierdzenie wyników niezależną metodą (ang. *northern blot*, *reverse northern*). Tym sposobem ogranicza się liczbę fałszywych informacji wynikających z heterogeniczności materiału wyjściowego.

Najważniejszymi zaletami różnicowego profilowania ekspresji genów jest prostota analiz i możliwość wykrycia wszystkich rodzajów mRNA pojawiających się w badanym układzie, przy przebadaniu odpowiednio dużej liczby kombinacji starterów. Zastosowanie tej metody zyskuje na znaczeniu w sytuacji, gdy dysponujemy niewielką ilością wyjściowego RNA ( $\sim 0,1\mu\text{g}-0,2\mu\text{g}$ ). Do zalet różnicowego profilowania ekspresji genów można zaliczyć też możliwość jednoczesnego porównania więcej niż dwóch próbek RNA. Co więcej, taka analiza pozwala na stosunkowo proste przeglądanie różnicujących prążków cDNA, szybką ich izolację i łatwe klonowanie.

Różnicowe profilowanie ekspresji genów zostało wykorzystane do sklonowania wielu genów zwierzęcych i roślinnych, np. ulegających ekspresji podczas rozwoju kwiatu [38, 39], pojawiających się w odpowiedzi na czynniki hormonalne [40, 41], stres środowiskowy [42, 43].



## V. Podsumowanie

W ostatnich latach pojawiło się wiele metod służących analizie zróżnicowanej ekspresji genów na poziomie transkryptu. Każda z nich posiada pewne zalety, takie jak prostota wykonania i uniwersalność (różnicowe profilowanie ekspresji genów) czy ilość uzyskanej informacji (mikroukłady DNA). Wśród ograniczeń należy wymienić: wysokość ponoszonych kosztów (mikroukłady DNA), duża liczba fałszywych danych (różnicowe profilowanie ekspresji genów), czy analiza ekspresji głównie znanych genów (seryjna analiza ekspresji genów). Każdą z metod opracowano biorąc pod uwagę zapotrzebowanie na konkretne rozwiązania, które pozwoliłyby zgromadzić więcej informacji o zróżnicowanej ekspresji genów w badanych układach. Standardowe metody analizy ekspresji genów takie jak *northern-blot*, hybrydyzacja subtraktywna, hybrydyzacja różnicowa są kosztowne a często nie dość czułe by wykryć rzadkie rodzaje mRNA. Okazują się jednak niezbędne do klonowania cDNA pełnej długości i przy określaniu wielkości transkryptu. Biorąc pod uwagę użyteczność i efektywność stosowanych analiz, różnicowe profilowanie ekspresji genów i supresyjna hybrydyzacja odejmująca wydają się najwygodniejszymi metodami do określania zróżnicowanej ekspresji genów na skalę małych laboratoriów.

Artykuł otrzymano 6 listopada 2000 r.  
Zaakceptowano do druku 11 czerwca 2001 r.

## Piśmiennictwo

1. <http://www.nature.com/genomics/>
2. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) W: *Molecular Cloning. A Laboratory Manual* 2<sup>nd</sup> ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, str. 8.46-8.48
3. Scherer G, Telford I, Baldari C, Pirrotta V (1981) *Dev Biol* **86** (2): 438-447
4. Weeks DL, Rebagliati MR, Harvey RP, Melton DA, (1985) *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol* **50**: 21
5. Lopez-Fernandez LA., del Mazo J (1993) *BioTechniques* **15** (4):654-656, 658-659
6. Hara E, Kato T, Nakada S, Sekiya S, Oda K (1991) *Nucleic Acids Res* **19** (25): 7097-7104
7. Timblin C, Battey J, Kuehl WM (1990) *Nucleic Acids Res* **18** (6): 1587-1593
8. Schena M, Schalon D, Davis RW., Brown PO (1995) *Science* **270**: 467-470
9. Fodor SPA, Rava RP, Huang XC, Pease AC, Holmes CP, Adams SL (1993) *Nature* **364**: 555-556
10. Pease AC, Solas D, Sullivan EJ, Cronin MT, Holmes CP, Fodor SPA (1994) *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**: 5022-5026
11. Southern EM (1996) *Trends Genet* **12**: 110-115
12. Freeman WM, Robertson DJ, Vrana KE (2000) *Bio-techniques* **29** (5): 1042-6, 1048-55
13. Chee M (1996) *Science* **274**: 610-614
14. Duggan DJ, Bittner M, Chen Y, Meltzer P, Trent J (1999) *Nat Genet* **21**: 10-14
15. Bowtell DDL (1999) *Nat Genet* **21**: 25-32
16. Baldwin D, Crane V, Rice D, (1999) *Curr Opin Plant Biol* **2**: 96-103
17. Brown MPS, Grundy WN, Lin D, Cristianini N, Sugnet CW, Furey TS, Ares M, Haussler D (2000) *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 262-267
18. <http://www.stat.stanford.edu/~tibs/research>
19. Lisysin N, Lisysin N, Wigler M (1993) *Science* **259**: 946-951
20. Hubank M, Schatz DG, (1994) *Nucleic Acids Res* **22**: 5640-5648
21. Siebert PD, Chenchik A, Kellogg DE, Lukianov KA, Lukianov S.A. (1995) *Nucleic Acids Res* **23**: 1087-1088
22. Hino O, Kobayashi E, Nishizawa M, Kubo Y, Kobayashi T, Hirayama Y, Takai S, Kikuchi Y, Tsuchiya H, Orimoto K, (1995) *J. Cancer Res Clin Oncol* **121**: 602-605
23. Tsuchiya H, Tsuchiya Y, Kobayashi T, Kikuchi Y, Hino O (1994) *Jpn J Cancer Res* **85**: 1099-1104
24. Kim JY, Chung YS, Ok. SH, Lee SG, Chung WI, Kim IY, Shin JS (1999) *Biochim Biophys Acta* **1489**: 389-392
25. Adams MD, Kelley JM, Gocayne JD (1991) *Science* **252**: 1651-1656
26. Cooke R i wsp, (1996) W: *Plant Gene Isolation*, John Wiley & Sons Ltd, England, 401-419
27. Velculescu VE, Zhang L, Vogelstein B, Kinzler KW (1995) *Science* **270**: 484-487
28. Zhang L (1997) *Science* **276**: 1268-1272
29. Polyak K, Xia Y, Zweier JL, Kinzler KW, Vogelstein B (1997) *Nature* **389**: 300-305
30. [http://sciencepark.mdanderson.org/gggeg/RAGE\\_technique](http://sciencepark.mdanderson.org/gggeg/RAGE_technique).
31. Liang P, Pardee AB (1992) *Science* **257**: 967-971
32. McClelland M, Mathieu-Daude F, Welsh J (1995) *Trends Genet* **11**: 242-246
33. Vietor I, Huber LA (1997) *Biochim Biophys Acta* **1359**: 187-199
34. Kozian DH, Kirschbaum BJ (1999) *Trends Biotechnol* **17**: 73-78
35. Ayala M, Balint RF, Fernandez-de-Cossio ME, Canaan-Haden L, Larrick JW, Gavilondo JV (1995) *BioTechniques* **18**: 844-850
36. Linskens MH, Feng J, Andrews WH, Enlow BE, Saati SM, Tonkin LA, Funk WD, Villeponteau B (1995) *Nucleic Acids Res* **23**: 3244-3251
37. Zhao S, Ooi SL, Pardee AB (1995) *BioTechniques* **18** (5): 842-850
38. Li HY, Gray JE (1997) *Plant Mol Biol* **33**: 653-665
39. Sablowski RWM, Meyerowitz EM (1998) *Cell* **92**: 93-103
40. Van der Knaap E, Jagoueix S, Kende H (1997) *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 9979-9983
41. Zegzouti H, Jones B, Marty C, Lelievre JM, Latche A, Pech JC, Bouzayen M (1997) *Plant Mol Biol* **35**: 847-854
42. Sharma YK, Davis KR (1995) *Plant Mol Biol* **29**: 91-98
43. Kadyrzhanova DK, Vlachonasios KE, Ververidis P, Dilley DR (1998) *Plant Mol Biol* **36**: 885-895
44. Liang P, Pardee AB (1997) W: *Methods in Molecular Biology* vol. 85, Differential Display Methods and Protocols, Humana Press
45. Primrose SB (1999) W: Gładkowska M. (red): *Zasady analizy genomu*; Wydawnictwo Naukowo Techniczne, Warszawa, str. 205

# Mechanizm, regulacja i rola bioluminescencji bakterii

## The mechanism, regulation and the role of bacterial bioluminescence

AGATA CZYŻ<sup>1</sup>, GRZEGORZ WĘGRZYN<sup>2, 3</sup>

### Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Biochemiczny mechanizm luminescencji bakterii
- III. Regulacja produkcji światła przez bakterie w odpowiedzi na gęstość hodowli
- IV. Biologiczna rola luminescencji bakterii
- V. Uwagi końcowe

**Wykaz stosowanych skrótów:** AI-1 — autoinduktor systemu I; AI-2 — autoinduktor systemu II; OHL — lakton *N*-oktanol-*L*-homoseryny; OHHL — lakton *N*-(3-oksyheksanol)-*L*-homoseryny

### I. Wstęp

Bioluminescencja, czyli wytwarzanie światła przez żywe organizmy, jest procesem rozpowszechnionym w przyrodzie. Do emisji światła zdolne są nie tylko bakterie czy grzyby, lecz również niektóre bezkręgowce i kręgowce. Mechanizmy powstawania światła w komórkach różnych organizmów są ogólnie dość podobne, różnią się jedynie szczegółami. Wydaje się jednak, że bioluminescencja u organizmów należących do niespokrewnionych ze sobą grup powstawała raczej niezależnie w toku ewolucji [1].

Bioluminescencja bakterii występuje głównie, choć nie wyłącznie, u gatunków związanych ze środowiskiem morskim. Mechanizmy bioluminescencji zostały najlepiej poznane u dwóch gatunków należących do rodzaju *Vibrio*: *V. fischeri* i *V. harveyi*. Regulacja procesu świecenia u *V. harveyi* wydawała się bardziej złożona niż u *V. fischeri*, jednak wyniki

### Contents

- I. Introduction
- II. Biochemical mechanism of bacterial luminescence
- III. Regulation of bacterial light emission — quorum sensing
- IV. The biological role of bacterial luminescence
- V. Concluding remarks

ostatnich badań sugerują, że procesy kontroli wytwarzania światła przez komórki *V. fischeri* mogą być równie skomplikowane [2]. Oba mechanizmy zostaną omówione w tym artykule jako przykładowe, co pozwoli na głębszą analizę genetycznej i biochemicznej kontroli zjawiska bioluminescencji.

O ile bioluminescencji zwierząt można przypisać funkcje komunikowania się pomiędzy osobnikami tego samego gatunku, odstraszenia napastnika lub zwabiania ofiary, to biologiczna rola emisji światła przez bakterie pozostawała do niedawna zupełnie nieznana. Dopiero ostatnie lata przyniosły doniesienia mogące wytłumaczyć fizjologiczną i biochemiczną funkcję luminescencji komórek bakteryjnych. Problem ten zostanie dokładniej omówiony pod koniec tego artykułu.

### II. Biochemiczny mechanizm luminescencji bakterii

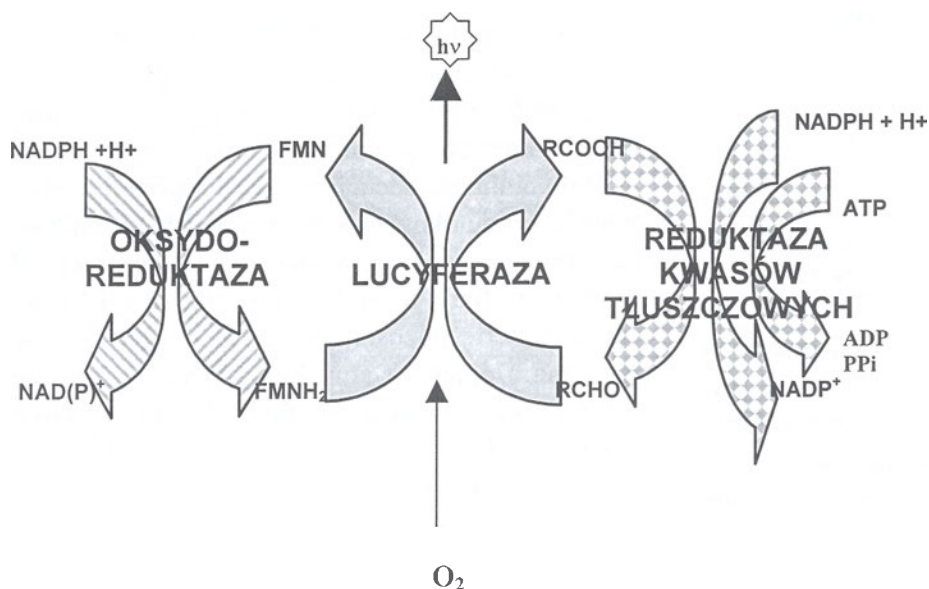
Mechanizmy umożliwiające emisję światła przez komórki bakteryjne oraz regulacja tego zjawiska zostaną przedstawione na przykładzie dwóch typowo morskich bakterii: *Vibrio fischeri* oraz *Vibrio harveyi*. *V. fischeri* jest symbiontem występującym w organach świetlnych ryb z rodziny Monocentridae oraz głowonogów z rodzajów *Sepiola* i *Euprymna*, [3, 4]. *V. harveyi* to bakteria z reguły wolnożyjąca, lecz spotykana także na powierzchni ciała oraz w jelitach niektórych zwierząt morskich [5, 6]. Produkcja światła przez bakterie luminescencyjne katalizowana jest przez lucyferazę. Enzym ten składa się z dwóch podjednostek  $\alpha$  i  $\beta$  kodowanych, odpowied-

<sup>1</sup>Dr, Pracownia Biologii Molekularnej afiliowana przy Uniwersytecie Gdańskim, Instytut Biochemii i Biofizyki Polskiej Akademii Nauk, ul. Kładki 24, 80-822 Gdańsk; <sup>2</sup>prof. dr hab., Katedra Biologii Molekularnej, Uniwersytet Gdański, ul. Kładki 24, 80-822 Gdańsk; <sup>3</sup>Centrum Biologii Morza Polskiej Akademii Nauk, ul. Św. Wojciecha 5, 81-347 Gdynia

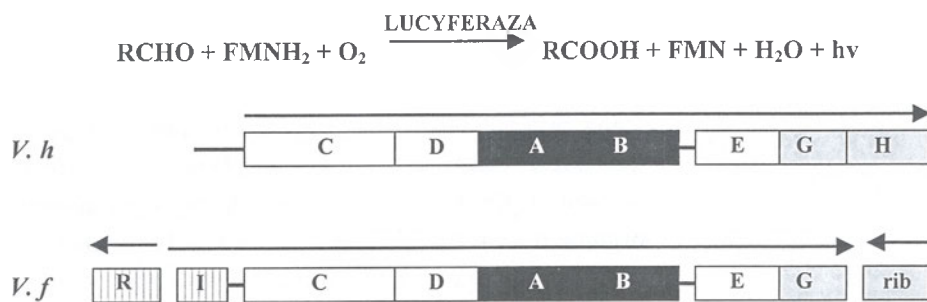
nio, przez geny *luxA* i *luxB* [7]. Lucyferaza katalizuje reakcję oksydacji zredukowanej flawiny (FMNH<sub>2</sub>) do flawiny (FMN) i długołańcuchowych aldehydów do kwasów tłuszczowych. Specyficzna reduktaza bierze udział w redukcji cząsteczek kwasów tłuszczowych do aldehydów [8]. Reduktaza ta wykazuje dwie aktywności: reduktazy acylo-CoA zależnej od NADPH oraz syntetazy acylobiałkowej zależnej od ATP. Siła redukcyjna układu luminescencji jest generowana przez oksydoreduktazę NAD(P)H-FMN [9] (Ryc. 1).

Organizacja genów związanych z luminescencją u bakterii *V. fischeri* i *V. harveyi* znacząco się różni (Ryc. 2) [10]. U *V. fischeri* geny odpowiedzialne za luminescencję bakterii tworzą regulon na który składają się dwa transkrybowane w przeciwnych kierunkach operony — skierowany „w prawo” operon R oraz skierowany „w lewo” operon L [11]. Do operonu R należą geny *luxCDABEG* kodujące enzymy niezbędne do produkcji światła (geny *luxA* i *luxB* kodują podjednostki α i β lucyferazy; *luxC*, *luxD* i *luxE* to

geny kompleksu reduktazy kwasów tłuszczowych; *luxG* koduje białko odpowiedzialne za syntezę zredukowanej flawiny) oraz gen *luxI* kodujący białko odpowiedzialne za syntezę niskocząsteczkowej substancji sygnałowej zwanej autoinduktorem [10, 11]. W przypadku *V. fischeri* substancją tą jest lakton *N*-(3-oksyheksanolo)-*L*-homoseryny [10-12]. W skład operonu L wchodzi tylko jeden gen — *luxR* kodujący białko czujnikowe dla substancji sygnałowej. Utworzony kompleks autoinduktor-białko LuxR wpływa zarówno na transkrypcję operonu R (pozytywne sprzężenie zwrotne) jak i operonu L (negatywne sprzężenie zwrotne) (Ryc. 3) [10, 11]. Wyniki ostatnich badań wskazują na obecność u *V. fischeri* drugiego układu sygnalizacyjnego, który przypomina analogiczny układ występujący u *V. harveyi* (opisany poniżej). Na układ ten składa się gen *ainS*, kodujący białko odpowiedzialne za syntezę drugiego autoinduktora — laktonu *N*-oktanolo-*L*-homoseryny, oraz gen regulatorowy *ainR* [2]. W komórkach *V. fischeri* wykryto także homologi genów *luxO* i

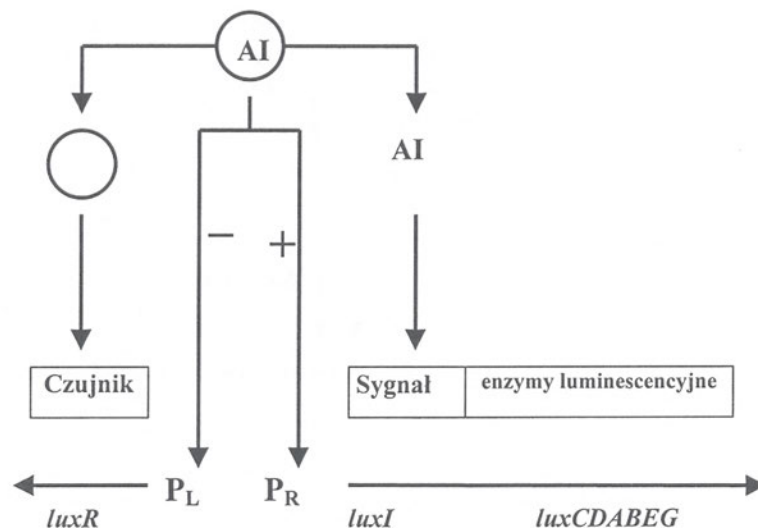


Ryc. 1. Substraty, produkty i enzymy biorące udział w procesie bioluminescencji u bakterii *V. harveyi*.



Ryc. 2. Schemat ilustrujący organizację operonów *lux* u bakterii *V. harveyi* (*V. h*) i *V. fischeri* (*V. f*). Umieszczone na rysunku litery oznaczają odpowiednie geny: R — *luxR*, I — *luxI*, C — *luxC*, D — *luxD*, A — *luxA*, B — *luxB*, E — *luxE*, G — *luxG*, H — *luxH*, rib- geny związane z syntezą ryboflawiny. Kierunki transkrypcji znaczone strzałkami. Czarne prostokąty symbolizują geny kodujące podjednostki lucyferazy, szare prostokąty — geny kodujące białka zaangażowane w produkcję pochodnych flawinowych, białe prostokąty — geny kodujące białka kompleksu reduktazy kwasów tłuszczowych, prostokąty w paski — geny kodujące białka regulatorowe.





**Ryc. 3.** Schemat regulacji luminescencji u bakterii *Vibrio fischeri*. Poziomą syntezę enzymów luminescencyjnych w komórkach *V. fischeri* zależy od poziomu transkrypcji operonu R obejmującego geny *luxICDABEG*. Transkrypcja operonu R jest regulowana pozytywnie przez poziom autoinduktora, syntetyzowanego przez produkt genu *luxI*, oraz negatywnie — przez białko czujnikowe LuxR, produkt genu *luxR*. Przy małej ilości komórek transkrypcja operonu R zachodzi konstytutywnie na niskim poziomie, stąd niskie stężenie autoinduktora w otoczeniu. Gdy ilość komórek wzrasta, wzrasta też stężenie autoinduktora, co powoduje indukcję transkrypcji operonu *luxICDABEG* i emisję światła. W przypadku genu *luxI* mamy do czynienia ze zjawiskiem pozytywnego sprzężenia zwrotnego — wzrost poziomu autoinduktora w otoczeniu powoduje wzrost poziomu syntazy autoinduktora w komórce. Regulacja negatywna zachodzi przez obniżenie ekspresji operonu L, zawierającego gen *luxR* i wymaga interakcji LuxR i autoinduktora. Na rysunku umieszczono nazwy genów kodujących poszczególne elementy systemu luminescencji. Zastosowane skróty oznaczają: AI — autoinduktor, p<sub>L</sub> — promotor operonu L, p<sub>R</sub> — promotor operonu R.

*luxU*, dobrze poznanych u *V. harveyi* (opisanych poniżej).

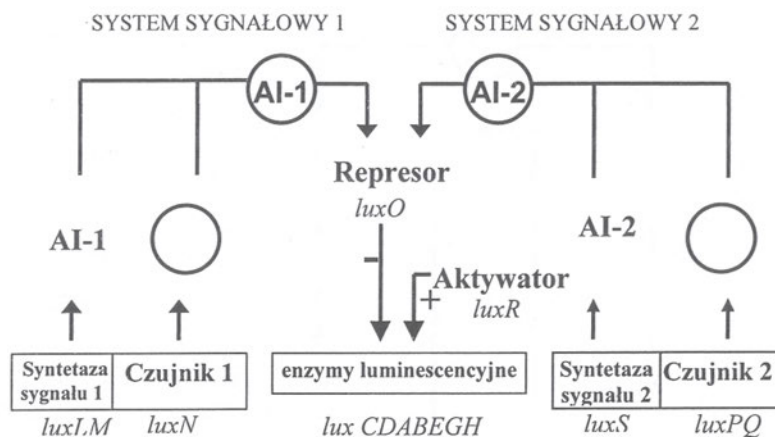
U *V. harveyi* zidentyfikowano następujące geny zaangażowane w produkcję światła: geny operonu *luxCDABEGH*, geny regulatorowe — *luxR*, *luxO*, *luxU*, geny kodujące syntetazy autoinduktorów — *luxLM* (geny kodujące syntetazę autoinduktora układu sygnałowego 1: AI-1) i *luxS* (gen kodujący syntetazę autoinduktora układu sygnałowego 2: AI-2), oraz geny kodujące czujniki dla substancji sygnałowych — *luxN* (gen kodujący czujnik systemu 1) i *luxPQ* (geny kodujące czujnik systemu 2). [11, 13-17]. Geny operonu *luxCDABEGH* bakterii *V. harveyi* transkrybowane właśnie w tej kolejności kodują białka enzymatyczne, niezbędne do emisji światła przez bakterię: geny *luxA* i *luxB* kodują podjednostki  $\alpha$  i  $\beta$  lucyferazy; *luxC*, *luxD* i *luxE* to geny kompleksu reduktazy kwasów tłuszczowych; *luxG* i *luxH* kodują białka odpowiedzialne za syntezę zredukowanej flawiny [8, 18]. Aktywatorem transkrypcji operonu *luxCDABEGH* jest produkt genu *luxR* [19-21]. Białko LuxR *V. harveyi* nie wykazuje żadnej homologii do białka LuxR pochodzącego z bakterii *V. fischeri* — użycie tej samej nazwy jest tutaj przypadkowe. Funkcję negatywnego regulatora pełni produkt genu *luxO* [14]. Aktywność białka LuxO regulowana jest przez obecność w środowisku substancji sygnałowych zwanych autoinduktorami [22]. Bakteria *V. harveyi* wytwarza dwa typy autoindukto-

rów należących do dwóch niezależnych układów sygnałowych. Autoinduktory łącząc się z odpowiednimi białkami czujnikowymi powodują w efekcie końcowym inaktywację białka LuxO (Ryc. 4).

### III. Regulacja produkcji światła przez bakterie *V. fischeri* oraz *V. harveyi* w odpowiedzi na gęstość hodowli

Efektywność luminescencji bakterii *V. fischeri* i *V. harveyi* zależy wyraźnie od gęstości hodowli. Różnica w poziomie emisji światła pojedynczej bakterii z „gęstej” i „rozcieńczonej” hodowli może być 1000-krotna. Wynika to ze zwiększonej w warunkach dużej koncentracji komórek bakteryjnych produkcji substancji sygnałowych i odpowiedzi komórek bakteryjnych na te substancje [22]. Zjawisko to określa się jako „zmysł gęstościowy” (ang. *quorum sensing*).

Według powszechnie akceptowanego modelu regulacji luminescencji w komórkach *V. fischeri* przyjmowano, że bakteria ta wytwarza tylko jeden typ autoinduktora — lakton *N*-(3-oksyheksanolo)-L-homoseryny (OHHL) [10-12]. W miarę wzrostu gęstości hodowli autoinduktor akumuluje się w otoczeniu. Po przekroczeniu wartości progowej stężenia autoinduktora dochodzi do utworzenia kompleksu OHHL-białko czujnikowe LuxR. Kompleks ten na drodze pozytywnego sprzężenia zwrotnego stymulu-

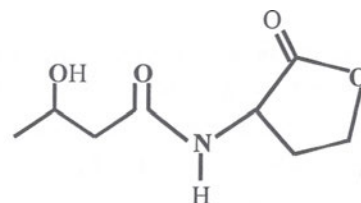


Ryc. 4. Schemat ilustrujący genetyczną kontrolę luminescencji u bakterii *V. harveyi*. Ekspresja genów operonu *luxCDABEGH* kodujących enzymy odpowiedzialne za luminescencję bakterii jest kontrolowana przez dwa niezależne układy sygnałowe oznaczone jako 1 i 2. W obu układach sygnałowych produkowane są wewnątrzkomórkowe substancje sygnałowe (AI-1 lub AI-2) zwane autoinduktorami oraz substancje zwane sensorami lub czujnikami, oznaczone na rysunku jako kółka, regulujące odpowiedź na daną substancję sygnałową. Odpowiednie substancje sygnałowe (AI-1 lub AI-2) łączą się z odpowiednim czujnikiem. Białka sensorowe regulują ekspresję genów luminescencyjnych inaktywując kodowany przez gen *luxO* pośredni negatywny regulator operonu *luxCDABEGH*. Ekspresja operonu *luxCDABEGH* podlega także kontroli pozytywnej w wyniku oddziaływań czynnika transkrypcyjnego LuxR. Na rysunku umieszczono nazwy genów kodujących poszczególne elementy systemu luminescencji.

je transkrypcję operonu *luxICDABEG* w wyniku czego dochodzi do emisji światła przez komórki bakteryjne. Poziom syntezy autoinduktora podlega zatem pozytywnej autoregulacji. Wykazano ponadto, że para autoinduktor–LuxR może wpływać tak hamująco (w warunkach wysokiej koncentracji białka LuxR) jak i aktywująco (w warunkach niskiej koncentracji białka LuxR oraz autoinduktora) na ekspresję genu *luxR* [10, 11]. Wyniki prowadzonych w ostatnich latach eksperymentów wskazują jednakże, że przedstawiony powyżej mechanizm jest niepełny. W komórkach *V. fischeri* wykryto obecność drugiego autoinduktora — laktonu *N*-oktanolo-*L*-homoseryny (OHL). Obecność autoinduktora OHL w komórce wpływa hamująco na tworzenie kompleksów OHHL-LuxR. Oddziaływanie autoinduktora OHL z białkiem regulatorowym AinR powoduje natomiast aktywację genów operonu *luxICDABEG* i co za tym idzie wzrost emisji światła przez komórkę [23, 24]. Opublikowane ostatnio dane wskazujące na udział w regulacji luminescencji bakterii *V. fischeri* dodatkowych genów — *luxO* oraz *luxU*, zidentyfikowanych uprzednio u *V. harveyi*, wskazują, że regulacja emisji światła w komórkach *V. fischeri* wciąż do końca nie została poznana [2].

Bakteria *V. harveyi* produkuje autoinduktory dwóch typów: lakton *N*-(3-hydroksybutyrylo)-*L*-homoseryny, zwany w skrócie AI-1 (Ryc. 5), należący do pierwszego układu sygnałowego oraz niezidentyfikowany jeszcze związek AI-2, należący do drugiego układu sygnałowego [15, 17]. Oprócz substancji sygnałowych w każdym układzie sygnałowym obec-

ne są białka zwane czujnikami (sensorami) regulujące odpowiedź komórki na dany autoinduktor. Sensor układu 1 to białko LuxN [25]. Sensor układu 2 składa się z dwóch białek — LuxP i LuxQ [13] (Ryc. 2). Białko LuxP jest rozpuszczalnym białkiem periplazmatycznym, podobnym do białka wiążącego rybozę i galaktozę u *Escherichia coli* i *Salmonella typhimurium*. Białka LuxN i LuxQ należą do rodziny białkowych czynników sygnałowych wykazujących aktywności kinazy i fosfatazy [11]. Gdy autoinduktory występują w niskim stężeniu (mała gęstość komórek) białka LuxN i LuxQ fosforylują LuxO w pozycji Asp-47. Fosforylowane białko

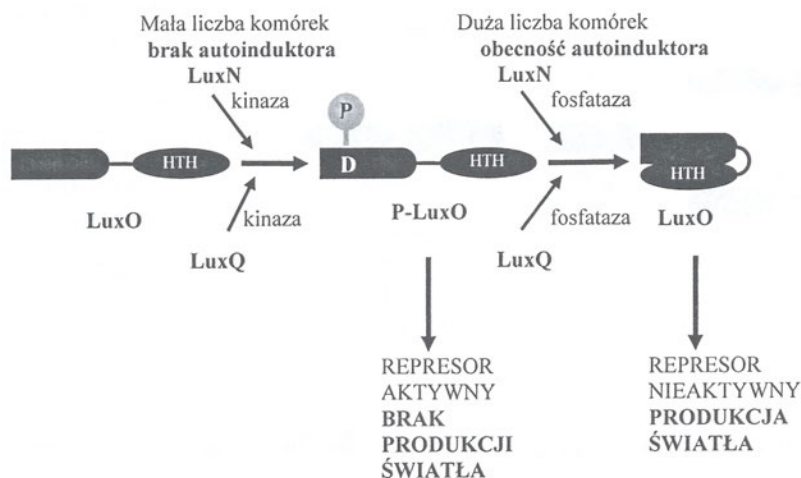


Ryc. 5. Lakton *N*-(3-hydroksybutyrylo)-*L* homoseryny

LuxO jest negatywnym regulatorem aktywności operonu *luxCDABEGH*. Początkowo sądzono, że LuxO jest specyficznym represorem promotora tego operonu, jednak najnowsze doniesienia wskazują, że jest to raczej ogólny czynnik regulacyjny, a faktycznym represorem jest inne, jak dotąd niezidentyfikowane białko. Gen kodujący to białko jest prawdopodobnie aktywowany przez kompleks LuxO- $\sigma^{54}$  [26]. W przypadku akumulacji cząsteczek autoinduktorów w otoczeniu (duża gęstość hodowli) LuxN i LuxQ wy-

kazują aktywność fosfatazy. W wyniku defosforylacji LuxO dochodzi do takich zmian konformacyjnych w cząsteczce białka LuxO, że nie może ono pośrednio hamować aktywności operonu *luxCDABEGH*. W efekcie tego następuje ekspresja genów operonu *luxCDABEGH* czego ostatecznym wynikiem jest emisja światła przez komórki *V. harveyi* (Ryc. 6).

Za odbieranie informacji z sensorów LuxN i LuxQ i przeniesienie sygnałów na białko regulatorowe LuxO odpowiedzialna jest fosfataza LuxU. Model



Ryc. 6. Schemat regulacji „zmysłu gęstościowego” (ang. *quorum sensing*) u *V. harveyi*. W przypadku gdy bakteria występuje w środowisku o niskiej gęstości komórek i autoinduktor występuje w niskim stężeniu czujniki (sensory) LuxN oraz LuxQ mają aktywność kinazy. Następuje fosforylacja białka LuxO w pozycji Asp47. Fosforylowane białko LuxO jest pośrednim regulatorem negatywnym operonu *luxCDABEGH*, co powoduje brak emisji światła. Akumulacja autoinduktorów (AI-1 oraz AI-2) w otoczeniu podczas wzrostu ilości komórek powoduje, że LuxN i LuxQ wykazują aktywność fosfatazy. W wyniku defosforylacji LuxO dochodzi do zmian konformacyjnych w cząsteczce białka unieczynniającej ten regulator, zachodzi ekspresja genów operonu *lux* i *V. harveyi* emituje światło. Zarówno aktywacja jak i unieczynnienie LuxO przez LuxQ i LuxN zależy od fosfotransferazy LuxU. Stosowane w rysunku skróty oznaczają: D — Asp47, HTH — helisa-skłęt-helisa — domena białka LuxO, P-LuxO — ufosforylowane białko LuxO, LuxO — nieufosforylowane białko LuxO.

regulacji „zmysłu gęstościowego” przez kaskadę fosforylacji i defosforylacji przedstawia Ryc. 7. Część A ukazuje sytuację gdy liczba komórek jest niewielka. Przy braku autoinduktora czujniki LuxN i LuxQ wykazują aktywność kinazy — zachodzi autofosforylacja tych białek w wysoce konserwowanym miejscu H1 (His471). Grupa fosforanowa jest następnie przenoszona na asparaginę Asp771 w obrębie cząsteczek sensorów. Stąd grupa fosforanowa zostaje przeniesiona na histydynę w pozycji 58 białka LuxU (H2), a następnie na asparaginę (Asp47) białka LuxO. Jak zaznaczono wcześniej, fosforylowane białko LuxO pełni rolę pośredniego, negatywnego regulatora aktywności operonu *luxCDABEGH* — w opisanych warunkach nie dochodzi do ekspresji genów tego operonu i bakteria nie wytwarza światła. Przyłączenie się cząsteczek autoinduktorów (akumulujących się w otoczeniu w warunkach dużej koncentracji komórek bakteryjnych) do białek LuxN i

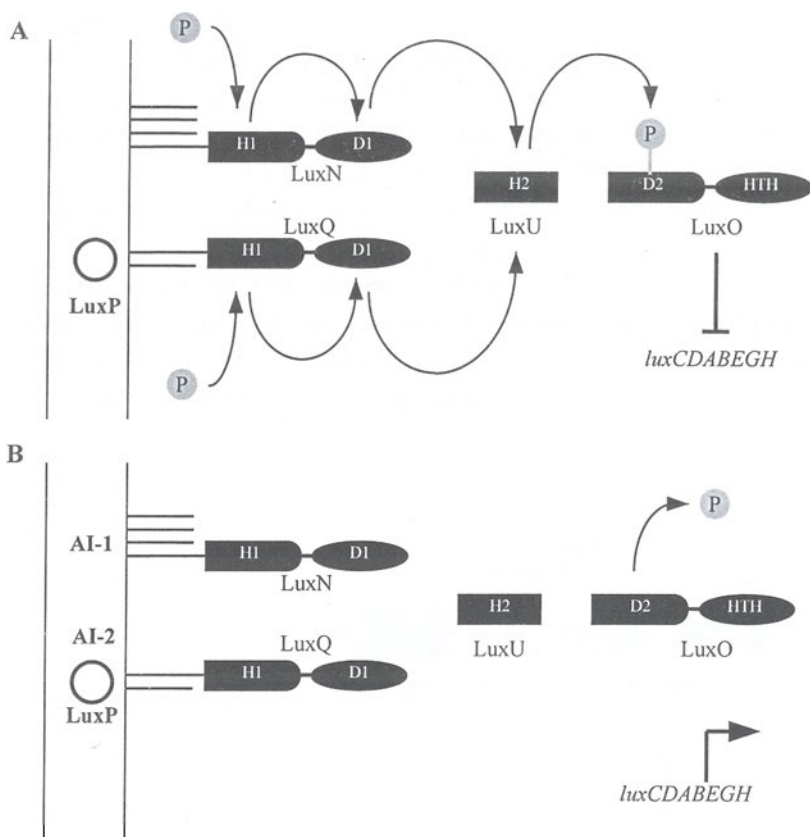
LuxQ stymuluje zmianę aktywności tych białek z kinaz na fosfatazy i zachodzi defosforylacja białka LuxO (Ryc. 7B) [15, 16]. Grupa fosforanowa jest przenoszona z LuxO (Asp47) na LuxU (His58), stąd na LuxN (Asp771) a następnie jest uwalniana w wyniku aktywności fosfatazy LuxN (przy barku aktywności kinazy tego białka) [27].

Mimo odkrycia wielu szczegółów kontroli luminescencji u *V. harveyi* na zasadzie „zmysłu gęstościowego”, wydaje się że ten rodzaj regulacji nie jest jeszcze do końca poznany. Ostatnie badania wska-

zują, że w proces ten zaangażowany jest produkt genu *cgtA* [28]. Gen *cgtA* koduje małe białko wiążące GTP, mające swoje homologi w wielu organizmach od bakterii do człowieka. Jest to białko, które potencjalnie może być zaangażowane w przeniesienie sygnałów na zasadzie kontroli fosforylacji i defosforylacji białek. Możliwe zatem, że bierze ono udział także w regulacji przekazywania sygnału za pośrednictwem autoinduktorów.

W 1979 roku wykazano, że produkcja światła w komórkach *V. harveyi* może być stymulowana przez autoinduktory produkowane przez inne gatunki bakterii, zarówno zdolne do luminescencji (*V. fischeri*, *V. longei*, *Photobacterium phosphoreum*) jak i nie wytwarzające światła (m.in. *V. parahaemolyticus*, *V. anguillarum*, *Yersinia enterocolitica*) [29]. Stwierdzono, że oprócz autoinduktora pochodzącego od *V. parahaemolyticus*, autoinduktory produkowane przez badane szczepy bakterii oddziałują z układem sygnaliza-





Ryc. 7. Schemat regulacji zmysłu gęstościowego u *V. harveyi* przez kaskadę fosforylacji i defosforylacji. Rysunek A obrazuje sytuację gdy liczba komórek jest niewielka (brak autoinduktorów w otoczeniu), rysunek B — gdy komórki znajdują się w dużej liczbie (duże stężenie autoinduktorów w otoczeniu). Stosowane na rysunku skróty oznaczają: H1 i D1 — miejsca fosforylacji w obrębie cząsteczek LuxN i LuxQ, H2 — His58 w obrębie białka LuxU, D2 — Asp47 w obrębie białka LuxO, HTH — helisa-skręt-helisa — domena białka LuxO.

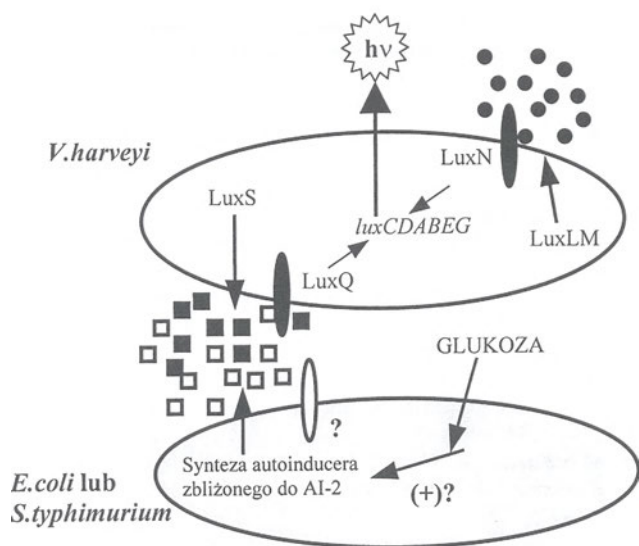
cyjnym 2 *V. harveyi* [30]. Wykazano także, że *E. coli* i *S. typhimurium* produkują substancje zbliżone do autoinduktora układu sygnalizacyjnego 2 (AI-2) *V. harveyi*, wywołujące indukcję świecenia u tej bakterii [31]. Ponieważ oprócz *V. harveyi* tylko jedna bakteria — *V. parahaemolyticus* — produkuje autoinduktor zbliżony do AI-1, wydaje się, że układ ten jest bardziej specyficzny. Możliwe, że funkcją bardziej specyficznego i wrażliwego układu sygnalizacyjnego 1 jest sprawdzanie czy w otoczeniu znajduje się dużo komórek *V. harveyi*, podczas gdy funkcją mniej specyficznego i mniej wrażliwego układu sygnalizacyjnego 2 jest badanie czy w otoczeniu znajdują się także inne gatunki bakterii [30-32] (Ryc. 8).

Regulacja ekspresji genów zależna od gęstości komórek, oparta na niskocząsteczkowych substancjach chemicznych zwanych autoinduktorami, będącymi pochodnymi laktonu homoseryny, nie jest procesem dotyczącym jedynie emisji światła u luminescencyjnych bakterii. Regulacja przy udziale „zmysłu gęstościowego” występuje u wielu bakterii Gram-ujemnych jak również Gram-dodatnich. W ten sposób zachodzi np. aktywacja koniugacyjnego transferu plazmidu Ti u *Agrobacterium tumefaciens* [33], ekspresja czynnika zakaźnego *Pseudomonas aeruginosa* [34], indukcja syntezy antybiotyków u *Pseudomonas aureofaciens* i *Erwinia carotovora* [35] i ekspresja czynników kontrolujących wzrost populacji *Rhizobium leguminosarum* [36].

#### IV. Biologiczna rola luminescencji bakterii

Do wytwarzania światła bakterie zużywają do kilkunastu procent całkowitej energii produkowanej przez komórkę [11, 37]. Proces luminescencji musi mieć zatem duże znaczenie dla tych organizmów, gdyż w przeciwnym razie zostałyby wyeliminowane na drodze ewolucji jako niekorzystny energetycznie. O ile rolę wytwarzania światła przez zwierzęta można stosunkowo łatwo przypisać komunikowaniu się różnych osobników tego samego gatunku, odstraszaniu napastnika lub zwabianiu ofiary, to biologiczne znaczenie luminescencji bakterii pozostawało przez długi czas nieznanne. Dotyczy to w szczególności luminescencyjnych bakterii wolnożyjących, chociaż nie jest też łatwo wytłumaczyć jaka jest konkretna korzyść z emisji światła dla bakterii żyjących w symbiozie ze zwierzętami. Bakterie mogą wprawdzie emitować światło ale nie są zdolne do odbierania bodźców świetlnych — nie może więc tu być mowy o komunikowaniu się ze sobą. Nie można też zakładać w tym przypadku funkcji odstraszania napastnika ani zwabiania ofiary.

Wysunięto hipotezę, że katalizowany enzymatycznie proces prowadzący do produkcji kwantów światła mógł ewoluować jako mechanizm detoksyfikacji reaktywnych form tlenu [1]. Rzeczywiście, ostatnio uzyskane dane doświadczalne sugerują, że w pewnych warunkach aktywność lucyferazy w ko-



Ryc. 8. System komunikacji między komórkami *V. harveyi* i komórkami innych bakterii. Umieszczone na rysunku symbole oznaczają: ● — autoinduktor systemu 1 (AI-1) *V. harveyi* — lakton N-(3-hydroksybutyrylo)-L-homoseryny, ■ — autoinduktor systemu 2 (AI-2) *V. harveyi*, □ — autoinduktor typu AI-2 pochodzący z innej niż *V. harveyi* bakterii.

mórkach *V. harveyi* pozwala na efektywniejszą neutralizację toksycznych metabolitów pojawiających się w wyniku stresu oksydacyjnego [38]. Jednakże te same badania wskazały, że za tę ochronną rolę odpowiedzialna jest wyłącznie lucyferaza, bez udziału innych enzymów koniecznych do efektywnej luminescencji, zatem wytwarzanie światła jest w tym przypadku zbędne.

Nowych danych dotyczących biologicznej roli bioluminescencji bakterii dostarczyły badania, w których izolowano mutanty *V. harveyi* po mutageniezie transpozonowej. Otrzymano kolekcję mutantów niosących transpozon w różnych rejonach chromosomu [39, 40]. Dokładniejsza analiza fenotypów tych mutantów wykazała, że utracie zdolności do świecenia towarzyszyła podwyższona wrażliwość komórek na promieniowanie UV [40]. Okazało się mianowicie, że mutanty niezdolne do produkcji światła (i to zarówno te, które nie miały aktywnej lucyferazy jak i te niosące defekt w innym genie, niezbędnym do produkcji substratu dla tego enzymu) cechuje obniżona zdolność do naprawy DNA gdy po naświetlaniu promieniami UV hodowano je w ciemności, ale nie gdy dalszą hodowlę prowadzono przy dostępie światła widzialnego. Postawiono zatem hipotezę, że światło emitowane przez bakterie luminescencyjne może stanowić wewnętrzne źródło światła, stymulujące naprawę uszkodzeń DNA dzięki aktywacji fotolizy [40]. Hipotezę tę poparły doświadczenia, w których do bakterii *E. coli*, naturalnie niezdolnej do produkcji światła, wprowadzono geny *V. harveyi* warunkujące luminescencję. Zdolne do luminescencji komórki *E. coli* okazały się znacznie bardziej odporne na promieniowanie UV niż komórki typu dzikiego. Wydaje się, że dla bakterii żyjących w środowisku morskim efektywna naprawa DNA przez fotoreaktywa-

cję może mieć bardzo istotne znaczenie. Bakterie te, żyjąc w toni wodnej na różnych głębokościach, mają bardzo utrudniony dostęp do światła słonecznego. Wytworzenie wewnętrznego źródła światła zapewni aktywność fotolizy niezależnie od dostępności światła z zewnątrz.

Osobny problem stanowi regulacja efektywności luminescencji poprzez „zmysł gęstościowy”. Jeśli hipoteza o stymulacji fotoreaktywacji przez bioluminescencję jest słuszna, to wydajna produkcja światła powinna zachodzić niezależnie od gęstości bakterii, przynajmniej w warunkach zagrożenia komórki czynnikami mutagennymi. Rzeczywiście wykazano, że geny kodujące białka niezbędne w procesie luminescencji znajdują się pod negatywną kontrolą represora LexA, czyli są częścią regulonu SOS [40]. Wydajność luminescencji zwiększa się znacznie nawet w hodowlach bakteryjnych o niewielkiej gęstości po ich naświetlaniu promieniami UV [40]. Można w tym miejscu zastanawiać się, czy regulacja luminescencji poprzez „zmysł gęstościowy” może polegać na przygotowaniu bakterii do detoksyfikacji różnych związków i efektywnej naprawy DNA w warunkach dużego zagęszczenia komórek, co wiąże się na ogół z pojawieniem się w środowisku zwiększonego poziomu toksycznych metabolitów i innych substancji mutagennych.

## V. Uwagi końcowe

Badania nad zjawiskiem produkcji światła przez bakterie przyczyniły się nie tylko do poznania podstaw biochemicznych tego zjawiska, ale doprowadziły także do wykrycia mechanizmów regulacyjnych występujących dość powszechnie wśród organizmów prokariotycznych. „Zmysł gęstościowy”,

który po raz pierwszy opisano badając regulację bioluminescencji, okazał się niezmiernie interesującym zjawiskiem komunikowania się pomiędzy komórkami bakteryjnymi. Co ważniejsze, zjawisko to występuje m.in. podczas produkcji czynników infekcyjnych u bakterii patogennych a także w trakcie produkcji antybiotyków przez niektóre drobnoustroje. Innym interesującym zagadnieniem jest biologiczna rola luminescencji bakterii. Stwierdzenie, że rolą systemów wytwarzania światła może być stymulacja naprawy DNA i neutralizacja toksycznych metabolitów pojawiających się w wyniku stresu oksydacyjnego było zaskakujące, ale jednocześnie wskazało możliwości wykorzystania procesu luminescencji przez komórki. Prawdopodobnie konieczność efektywnego zabezpieczenia się przed szkodliwymi pochodnymi tlenu oraz konieczność skutecznej naprawy DNA uniezależnionej od zewnętrznych warunków środowiskowych (np. dostępu światła słonecznego) były motorem stymulującym ewolucję systemów bioluminescencji bakterii.

## Podziękowanie

Praca była finansowana przez Uniwersytet Gdański (BW 1190-5-0033-1)

*Artykuł otrzymano 18 stycznia 2001 r.  
Zaakceptowano do druku 16 lipca 2001 r.*

## Piśmiennictwo

1. Rees J-P, De Wergifosse B, Noiset O, Dubuisson M, Jansens B, Thompson EM (1998) *J Exp Biol* **201**: 1211-1221
2. Miyamoto CM, Lin YH, Meighen EA (2000) *Mol Microbiol* **36**: 594-607
3. Fitzgerald JM (1977) *Arch Microbiol* **112**: 153-156
4. Ruby EG (1996) *Annu Rev Microbiol* **50**: 591-624
5. Baumann P, Baumann L, Reichelt JL (1973) *J Bacteriol* **113**: 1144-1155
6. Ruby EG, Morin JG (1979) *Appl Environ Microbiol* **38**: 406-411
7. Belas R, Mileham A, Cohn D, Hilmen N, Simon M, Silverman M (1982) *Science* **218**: 791-793
8. Ziegler MM, Baldwin TO (1981) *Curr Top Bioenerg* **12**: 65-113
9. Jabłoński E, DeLuca M (1978) *Biochemistry* **17**: 672-678
10. Meighen EA (1994) *Annu Rev Genet* **28**: 117-139
11. Bassler BL, Silverman MR (1995) W: Hoch JA, Silhavy TJ (red) Two-Component Signal Transduction. American Society for Microbiology, Washington DC, str 431-445
12. Devine JH, Shadel GS, Baldwin TO (1989) *Proc Natl Acad Sci USA* **86**: 5688-5692
13. Bassler BL, Wright M, Silverman MR (1994) *Mol Microbiol* **13**: 273-286
14. Bassler BL, Wright M, Silverman MR (1994) *Mol Microbiol* **12**: 403-412
15. Freeman JA, Bassler BL (1999) *Mol Microbiol* **31**: 665-677
16. Freeman JA, Bassler BL (1999) *J Bacteriol* **181**: 899-906
17. Surette MG, Miller MB, Bassler BL (1999) *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 1639-1644
18. Meighen EA (1991) *Annu Rev Genet* **28**: 117-139
19. Showalter RE, Martin MO, Silverman MR (1990) *J Bacteriol* **172**: 2946-2954
20. Miyamoto CM, Chatterjee J, Schwartzman E, Szittner R, Meighen EA (1996) *Mol Microbiol* **19**: 767-775
21. Chatterjee J, Miyamoto CM, Meighen EA (1996) *Mol Microbiol* **20**: 415-425
22. Nealson KH, Platt T, Hastings JW (1970) *J Bacteriol* **104**: 313-322
23. Gilson R, Kuo A, Dunlap PV (1995) *J Bacteriol* **177**: 6946-6951
24. Kuo A, Callahan SM, Dunlap PV (1996) *J Bacteriol* **178**: 971-976
25. Bassler BL, Wright M, Showalter RE, Silverman MR (1993) *Mol Microbiol* **9**: 773-786
26. Lilley BN, Bassler BL (2000) *Mol Microbiol* **36**: 940-954
27. Freeman JA, Lilley BN, Bassler BL (2000) *Mol Microbiol* **35**: 139-149
28. Czyż A, Zielke R, Konopa G, Węgrzyn G (2001) *Microbiology* **147**: 183-191
29. Greenberg EP, Hastings JW, Ulitzur S (1979) *Arch Microbiol* **120**: 87-91
30. Bassler BL, Greenberg EP, Stevens AM (1997) *J Bacteriol* **179**: 4043-4045
31. Surette M, Bassler BL (1998) *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 7046-7050
32. Fuqua C, Greenberg P (1999) *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 6571-6572
33. Piper KR, Beck von Bodman S, Farrand SK (1993) *Nature* **362**: 448-450
34. Passandor L, Cook LM, Gambello MJ, Rust L, Iglewski BH (1993) *Science* **260**: 1127-1130
35. McGowan S, Sebahihia M, Jones S, Yu B, Bainton N, Chan PF, Bycroft B, Steward GSA, Williams P, Salmond GPC (1995) *Microbiology* **141**: 541-550
36. Gray KM, Pearson JP, Downie JA, Boboye BEA, Greenberg EP (1996) *J Bacteriol* **178**: 372-376
37. Nealson KH, Hastings JW (1979) *Microbiol Rev* **43**: 496-518
38. Czyż A, Węgrzyn G (2001) W: Case JF, Herring JP (red) *Bioluminescence and Chemiluminescence*, World Scientific Publishing Company, Singapore — w druku
39. Czyż A, Jasiołcki J, Bogdan A, Szpilewska H, Węgrzyn G (2000) *Appl Environ Microbiol* **66**: 599-605
40. Czyż A, Wróbel B, Węgrzyn G (2000) *Microbiology* **144**: 283-288



# Wskazówki dla Autorów

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

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

Autorzy artykułu odpowiadają za prawidłowość i ścisłość podawanych informacji oraz poprawność cytowanego piśmiennictwa. Ujęcie prac winno być syntetyczne, a przedstawione zagadnienia zilustrowane za pomocą tabel, rycin: wykresy, schematy, reakcje, wzory i fotografie.

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

Przekazanie artykułu do redakcji jest równoznaczne z oświadczeniem, że nadesłana praca nie była i nie będzie publikowana w innym czasopiśmie, jeżeli zostanie ogłoszona w „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:** prosimy o nadsyłanie dwóch egzemplarzy wydruku oraz dyskietki z tekstem zapisanym jako \*.doc w formacie IBM PC. Wydruk powinien być jednostronny z lewym marginesem około 4 cm, z zachowaniem podwójnego odstępu między wierszami, z użyciem czcionki Arial CE 11 lub 12. W przypadku stosowania w tekście liter alfabetu greckiego prosimy o wpisanie ółwkiem na marginesie ich fonetycznego brzmienia.

Strona informacyjna jest nienumerowana, zawiera imiona i nazwisko (a) Autora (ów), nazwy, adresy, telefony, adresy e-mail

zakładów, w których pracują Autorzy, adres do korespondencji, tytuł artykułu w języku polskim i angielskim oraz – w prawym dolnym rogu: liczbę tabel, rycin, wzorów i fotografii oraz skrócony tytuł pracy, zamieszczany na okładce czasopisma (do 25 znaków).

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

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

**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]. Odnośniki bibliograficzne powinny mieć nową, uproszczoną formę. Sposób cytowania czasopism (1), monografii (2), rozdziałów z książek jednotomowych (3), rozdziałów z tomów serii opracowanych przez różnych redaktorów (5) wskazują poniżej podane przykłady.

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

**ILUSTRACJE:** ryciny powinny być zapisane na dyskietce jako: \*.tif, lub \*.cdr, lub \*.psd, lub \*.eps. Fotografie czarno-białe (kontrastowe) powinny być wykonane na papierze matowym. Istniejące możliwości wykonania reprodukcji barwnych, ale ich koszty ponoszą Autorzy. Na rycinach nie należy umieszczać opisów słownych, lecz posługiwać się skrótami. Osie wykresów powinny być opatrzone napisem łatwo zrozumiałym. Decyzję o stopniu zmniejszenia ryciny podejmuje wydawca. Ilustracji nie należy włączać w tekst maszynopisu, lecz odpowiednio ponumerować: ryciny noszą cyfry arabskie, wzory zaś rzymskie. Na marginesie tekstu należy zaznaczyć ołwkiem preferowane miejsce umieszczenia ryciny czy wzoru. Słowne objaśnienia znaków graficznych można umieścić w podpisie pod ryciną, rysunkowe zaś jedynie na planszy ryciny. Tytuły i objaśnienia rycin sporządza się w postaci oddzielnego wykazu. Wydruki ilustracji należy na odwrocie podpisać imieniem i nazwiskiem pierwszego z Autorów i pierwszym słowem tytułu pracy oraz oznaczyć „górną-dół” (ołwkiem, na odwrocie). Ze względu na wewnętrzną spójność artykułu wskazane jest konstruowanie oryginalnych rycin i zbiorczych tabel na podstawie danych z piśmiennictwa.

Wydruk i załączniki (w dwu egzemplarzach) oraz dyskietkę, właściwie zabezpieczone przed uszkodzeniem w czasie transportu, prosimy przelać na adres:

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

## KOMUNIKAT ZARZĄDU GŁÓWNEGO POLSKIEGO TOWARZYSTWA BIOCHEMICZNEGO

Prosimy o wnoszenie opłat za składki członkowskie na nasze konto w PBK XIII Oddz. Warszawa nr 11101053-411050000371.

Jednocześnie uprzejmie informujemy, że decyzją Zarządu Głównego PTBioch. została zmieniona wysokość składki członkowskiej. W roku 2002 wynosi ona:

dla Członków rzeczywistych	70.- zł.
dla Członków studentów	35.- zł

**Członkowie, którzy opłacą składkę członkowską za rok 2002, otrzymają bezpłatną prenumeratę kwartalnika Polskiego Towarzystwa Biochemicznego „Postępy Biochemii”. Małżeństwa mogą opłacać: 70.- + 45.- = 115.-zł, otrzymają wówczas jeden egzemplarz „Postępów Biochemii”.**

Powyższe zmiany nie dotyczą Członków Honorowych Towarzystwa. Natomiast Członkowie-Emeryci – nadal zwolnieni z opłacania składki członkowskiej – płacą za prenumeratę „Postępów Biochemii” 25.- zł.

Biblioteki płacą za prenumeratę „Postępów Biochemii” w roku 2001 100.- zł.

## POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE

### ZAPROSZENIE

Jeżeli chciałabyś/chciałbyś zapisać się na listę e-mailową Polskiego Towarzystwa Biochemicznego wyślij e-mail na adres: [infoptbioch@nencki.gov.pl](mailto:infoptbioch@nencki.gov.pl). W polu „subject „ umieść swoje nazwisko i imię (w takiej kolejności i bez polskich znaków diakrytycznych) oraz adres e-mailowy. Wysyłając taki mail zgadzasz się na to, aby na Twój adres e-mailowy przychodziły informacje ZG, listy pojedynczych lub grup członków do ogółu członków, informacje z FEBS o zjazdach i kursach oraz materiały reklamowe. Lista będzie rozsyłać materiały kontrolowane przez moderatora, którym będzie Dariusz Stępkowski, sekretarz Zarządu Głównego Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, tak więc nie będzie Ci grozić zalew śmieciowej poczty i zawirusowanych „attachmentów”. Mam nadzieję, że tą drogą poprawi się stan poinformowania naszych członków o różnych wydarzeniach naukowych, stypendiach, kursach i wreszcie o aktywności poszczególnych oddziałów naszego Towarzystwa. Być może również „Listy do biochemików” redagowane przez p. Teresę Wesołowską będą obok wersji drukowanej kolportowane przez naszą listę. Zapraszam także do odwiedzenia strony [www naszego Towarzystwa](http://www.rcin.org.pl)

Dariusz Stępkowski

Sekretarz Zarządu Głównego  
Polskiego Towarzystwa Biochemicznego