

POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE

POSTĘPY BIOCHEMII

PL ISSN
0032-5422

Advances in Biochemistry

TOM 48, NR 2, 2002

Tadeusz Korzybski – wspomnienia	
Białka Cpn60 typu II	94
Zwijanie białek	101
Katepsyna B	111
Arszenik – lek czy trucizna	121
Jądrowe białka wiążące się z m ⁷ G.	131
Białka HCV	143

POŻEGNANIE PROFESORA KORZYBSKIEGO

W imieniu Zarządu Głównego Polskiego Towarzystwa Biochemicznego ze smutkiem żegnam Profesora Tadeusza Korzybskiego zmarłego w Warszawie 1. marca bieżącego roku.

Profesor Korzybski, wybitny uczony, wychowawca wielu pokoleń biochemików, był honorowym członkiem naszego Towarzystwa. Nadanie Profesorowi tej godności było oczywiste i naturalne, należał On bowiem do grona Członków Założycieli Towarzystwa Biochemicznego. W końcu lat pięćdziesiątych i sześćdziesiątych Profesor Korzybski był członkiem Redakcji Acta Biochimica Polonica. Pod auspicjami Towarzystwa zainicjował powstanie Komisji Słownictwa Biochemicznego i stanął na jej czele. Komisja ustaliła reguły polskiego nazewnictwa biochemicznego, które obowiązują do dzisiaj.

Wspominając Profesora Korzybskiego nie sposób pominąć tak ważnego okresu w Jego życiu, jakim była, jeszcze przed wojną, kilkuletnia współpraca z Jakubem Karolem Parnasem, wykładowcą chemii lekarskiej w Uniwersytecie Jana Kazimierza we Lwowie. Po wojnie, Tadeusz Korzybski podtrzymywał pamięć osoby Parnasa i jego słynnej lwowskiej szkoły biochemii. Profesor Korzybski należał do osób, dzięki którym Towarzystwo ustanowiło nagrodę za najlepszą wykonaną w kraju pracę doświadczalną z dziedziny biochemii, nazwaną nagrodą imienia Jakuba Karola Parnasa.

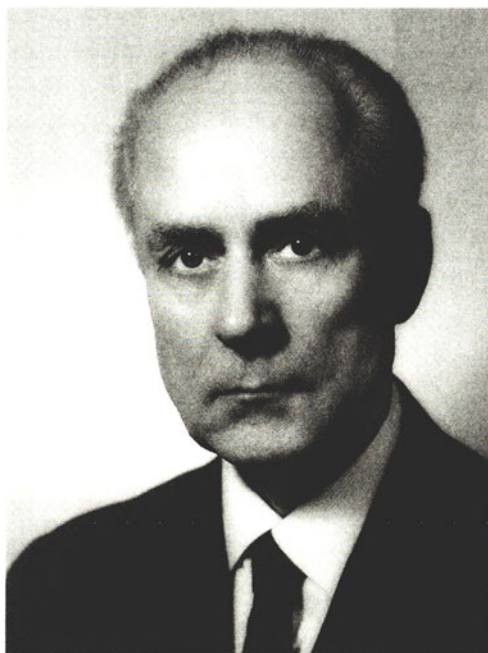
Profesor Korzybski serdecznie popierał inicjatywę Towarzystwa organizowania polsko-ukraińskich konferencji naukowych, nazywanych potocznie Konferencjami Parnasowskimi. Odbywają się one co dwa lata na przemian w Polsce i na Ukrainie, Pierwsza taka konferencja odbyła się w 1996 roku we Lwowie. Profesor ubolewał ogromnie, że zdrowie nie pozwoliło Mu w niej uczestniczyć.

Na koniec chciałam pozwolić sobie na bardziej osobistą refleksję. Profesor Korzybski był recenzentem mojej pracy doktorskiej, którą wykonałam w Instytucie Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN w Warszawie. Praca dotyczyła metabolizmu fosfolipidów i kwasów tłuszczowych. Z tego okresu zapamiętałam Profesora jako krytycznego, ale niezwykle otwartego i serdecznego człowieka, wielce pomocnego młodej osobie, jaką wówczas byłam.

Profesor Tadeusz Korzybski pozostanie w naszej życzliwej pamięci nie tylko jako naukowiec, ale i Człowiek.

Cześć Jego pamięci

Jolanta Barańska
Prezes Zarządu Głównego Polskiego Towarzystwa Biochemicznego



Ojciec polskiej penicyliny, członek rzeczywisty Polskiej Akademii Nauk, laureat wielu nagród naukowych, jeden z założycieli i członek honorowy Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, profesor dr hab. med. Tadeusz Korzybski urodził się w Mławie 4 czerwca 1906 roku. Jego Ojciec, Alojzy Korzybski, był cenionym w mieście lekarzem i szanowanym społecznikiem. Tadeusz wybrał studia medyczne i w wieku osiemnastu lat wstąpił na Wydział Lekarski Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie. W 1927 roku został asystentem, początkowo przy Katedrze Fizjologii, później Histologii tegoż Uniwersytetu, a w 1934 roku, po uzyskaniu dyplomu lekarza, rozpoczął kilkuletnią asystenturę przy Klinice Chorób Wewnętrznych.

Jeszcze przed uzyskaniem tytułu doktora wszech nauk lekarskich w 1937 roku Tadeusz Korzybski nawiązał kontakt z profesorem Jakubem Karolem Parnasem — kierownikiem Zakładu Chemii Lekarskiej, twórcą lwowskiej szkoły biochemii. Mam przed sobą oryginały listów profesora Parnasa, adresowanych do Tadeusza Korzybskiego. Dotyczą one uposażenia i terminu podjęcia asystentury w Uniwersytecie Jana Kazimierza. Z listów tych wynika, że nie tylko Tadeuszowi Korzybskiemu, lecz i Parnasowi zależało na nawiązaniu współpracy. Efekty ich badań podjętych w roku akademickim 1937/38 znaleźć można już w wykazie wspólnych publikacji z 1938 roku*. W badaniach tych Parnas i Korzybski, pierwsi

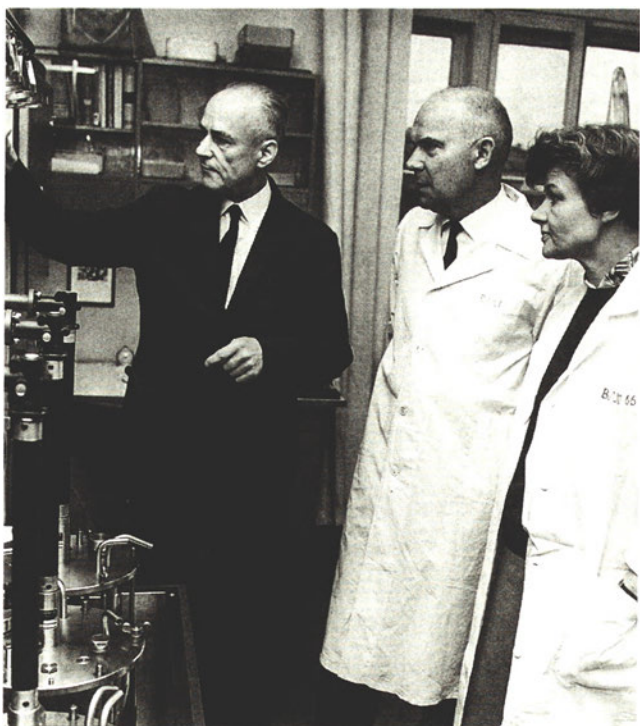
w świecie, zastosowali fosforan nieorganiczny wyznakowany radioaktywnym izotopem fosforu ^{32}P . Preparaty fosforanu otrzymywali od G. Hevesego drogą pocztową z Kopenhagi. Dzięki sprawnej i bezpośredniej komunikacji lotniczej między Kopenhagą a Lwowem preparaty w ciągu kilku godzin docierały do laboratorium Parnasa, a radioaktywne próbki doświadczalne powracały do laboratorium Hevesego. Tam je analizowano. We Lwowie bowiem nie było jeszcze wówczas odpowiedniej aparatury.

Zastosowanie radioaktywnego fosforanu pozwoliło uczonym polskim wyznaczyć szybkość wymiany reszt fosforanowych ATP i opisać jego rolę fizjologiczną. G. Hevesy, twórca tzw. znaczników izotopowych, otrzymał w 1943 roku Nagrodę Nobla. Wcześniej, w 1935 roku, Fryderyk Joliot-Curie dostał tę nagrodę za wykrycie radioaktywnego izotopu fosforu. Polscy uczeni Nobla nie otrzymali. Współpracę międzynarodową przerwała wojna. Okupant dążył do zniszczenia materialnego, biologicznego i kulturalnego Polski. Wielu uczonych polskich zginęło lub umarło podczas blisko sześć lat trwającej okupacji hitlerowskiej. W Warszawie zginął profesor Stanisław Przyłęcki. W Moskwie zmarł profesor Jakub Karol Parnas. Po wojnie ze Lwowa wyjechało wielu Jego uczniów i w powojennej Polsce tworzyli nowe ośrodki biochemiczne.

Dr Tadeusz Korzybski, jeszcze we Lwowie, szybko awansował: w jesieni 1937 rozpoczął pracę

jako asystent, ale parę lat później miał już tytuł docenta. W latach 1941-1944 był kierownikiem pracowni biochemicznej Kliniki Gruźliczej, w latach 1944 i 1945 — kierownikiem Katedry Chemii Organicznej Lwowskiego Instytutu Medycznego. W październiku 1945 opuścił Lwów: wyjechał do Krakowa, lecz wkrótce potem znalazł się w Warszawie i został kierownikiem Pracowni Biochemicznej w Państwowym Zakładzie Higieny i doradcą naukowym przy wytwórni penicyliny, a później przy Zakładzie Antybiotyków Instytutu Przemysłu Farmaceutycznego.

Na przełomie lat 1945/1946 uzyskano w naszym kraju pierwszy, niekrystaliczny preparat penicyliny. A Tadeusz Korzybski był tym, kto zdołał otrzymać jej pierwszy preparat krystaliczny. W roku 1946, wraz z profesorem Włodzimierzem Kuryłowiczem udał się On do Toronto w celu bliższego poznania technologii tego antybiotyku. Szczep produkujący penicylinę, *Penicillium chrysogenum*, technologia produkcji antybiotyku i aparatura były darem UNRRA dla Polski. Dar ten zawdzięczamy usilnym staraniom dr Ludwika Rajchmana, twórcy i pierwszego dyrektora PZH w Warszawie, a po wojnie przedstawiciela Polski w UNRRA w Waszyngtonie. W Zakładach Farmaceutycznych w Tarchominie już w 1950 roku uzyskano krystaliczny preparat penicyliny. Za uruchomienie produkcji profesorowie Włodzimierz Kuryłowicz i Tadeusz Korzybski otrzymali wówczas nagrodę państwową II stopnia.



W 1955 roku ukazało się pierwsze wydanie monografii p.t. „Antybiotyki. Pochodzenie, Rodzaje i Właściwości” autorstwa Tadeusza Korzybskiego i Włodzimierza Kuryłowicza. W dalszych, rozbudowanych wydaniach, współautorem była też dr chemii Zuzanna Kowszyk-Gindifer. Pierwsze polskie wydanie obejmowało około 600 stron, drugie — z 1959 roku — już 1228 stron, a wydanie z 1967 roku — 1740 stron. W miarę rozwoju produkcji antybiotyków zaistniała konieczność przygotowania ich poprawnego polskiego nazewnictwa. Stworzył je profesor Korzybski. Ukazały się też wydania obcojęzyczne Monografii: niemieckie, rosyjskie, angielskie i angloamerykańskie.

W 1954 roku Tadeusz Korzybski został profesorem nadzwyczajnym, a w 1966 profesorem zwyczajnym nauk medycznych. W Instytucie Biochemii i Biofizyki PAN pracował w latach 1956-1976. Był kierownikiem Zakładu Biochemii Porównawczej i wieloletnim Przewodniczącym Rady Naukowej. Bliższe kontakty naukowe i koleżeńskie Profesora z Instytutem trwały blisko pięćdziesiąt lat. W latach 1957-1959 był Redaktorem Kwartalnika „Acta Biochimica Polonica”. Był jednym z członków Założycieli Polskiego Towarzystwa Biochemicznego i w latach 1961-1963 kierował pracami Komisji Słownictwa Biochemicznego. Owocem tej działalności było opracowanie tomu p.t. „Słownictwo enzymów”.

W latach sześćdziesiątych otrzymał Profesor dwie nagrody państwowe za całokształt działalności naukowej. W 1973 roku uchwałą ogólnego zgromadzenia Polskiej Akademii Nauk został wybrany na jej Członka Rzeczywistego.

Na emeryturę profesor Korzybski przeszedł w styczniu 1977 roku. Jego kontakty z uczniami pozostały żywe i trwałe. Zmarł 1 marca 2002 roku w Warszawie przeżywszy 96 lat. Po uroczystej mszy w Kościele pod wezwaniem św. Andrzeja Boboli w Warszawie odbył się wzruszający pogrzeb w Mławie, gdzie jest grób Jego Rodziców. Żegnało Go tam społeczeństwo dorosłych i młodzież szkolna, dla której ustanowił stypendium imienia Korzybskich. Corocznie ze stypendium może korzystać kilkoro zdolnej młodzieży z rodzimej Mławy, by kształcić się w którejś ze szkół wyższych w kraju.

Tadeusz Korzybski był człowiekiem szeroko i głęboko wykształconym. Znał kilka języków. Wiele czytał. Pamiętam Go w kularach Filharmonii rozmawiającego z moim szefem, profesorem Włodzimierzem Niemierką: wspominali z ożywieniem wcześniejsze wykonania granych tego wieczoru utworów. W domu, często Tadeusz siadał do pianina — w warszawskich mieszkaniach miejsca na forte-

pian na ogół nie ma — i grywał, niekiedy przez kilka godzin, najczęściej Bacha. Przebywał wtedy w innym, lepszym świecie.

Miał wspaniałą pamięć i bardzo ciekawie opowiadał. Budził zaufanie. Pobudzał do myślenia. W 1984 roku — w stulecie urodzin Jakuba Karola Parnasa — profesor Tadeusz Korzybski przywrócił społeczności polskich biochemików pamięć o swym wielkim Nauczycielu. To dzięki profesorowi Korzybskiemu w 1985 roku podczas zjazdu w Krakowie odbyła się sesja biograficzna, w 1996 roku pierwsza polsko-ukraińska konferencja Parnasowska we Lwowie, w której Profesor nie mógł już uczestniczyć.

W siedemdziesiątym roku życia Profesor zdał egzamin na prawo jazdy i jeszcze kilkanaście lat jeździł — bezwypadkowo — po drogach Polski i Europy. Z wycieczek tych przywoził nie tylko fotografie, lecz także własnoręczne, znakomite, szkice zabytków, które Go szczególnie zafascynowały. Pamiętam wystawę tych szkiców w lokalu Warszawskiego Klubu Inteligencji Katolickiej. Pamiętam też swoje zdziwienie, gdy obejrzałam tę wystawę. Nigdy bowiem przedtem nie słyszałam o talentach rysowniczych profesora Korzybskiego.

*Hevesy G., Korzybski T., Parnas J.K. — Badania nad przemianą kwasu adenilowego w ustroju zwier-

zęcym (1938), *Spraw. Tow. Nauk., Lwów*, **18**, 112-113; Korzybski T., Parnas J.K. — Uber Abbau und Wiederaufbau der Adenylsäure im Warmblütermuskel (1938), *Z. Physiol. Chem.* **255**, 195-204; Korzybski T., Parnas J.K. — Observation sur les échanges des atomes du phosphore renfermés dans l'acide adénosinetriphosphorique, dans l'animal vivant, a l'aide du phosphore marqué par du radiophosphore ³²P (1939), *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **21**, 713-716

Post scriptum

Serdecznie dziękuję Koleżankom: prof. prof. Jolancie Barańskiej, Lilianie Konarskiej i Zuzannie Kowszyk-Gindifer oraz Koledze prof. Włodzimierzowi Zagórskiemu za udostępnienie materiałów biograficznych i bogatych w refleksje wspomnień, z których korzystałam przygotowując powyższy tekst o życiu i zasługach Profesora Tadeusza Korzybskiego.

Szczególnie serdecznie dziękuję pani Marii Korzybskiej za zgodę na moją wizytę w Piasecznie, za piękne fotografie do reprodukcji w kwartalniku „Postępy Biochemii” oraz za cenne uwagi dotyczące opracowanego przeze mnie tekstu.

Zofia Zielińska

23/24 kwietnia 2002

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
KRYSZYNA 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
EDWARD CZURYŁO (Warszawa)
EDWARD DARŻYŃKIEWICZ
(Warszawa)
MICHAŁ HETMAN (Warszawa)
JERZY OSIPIUK (Gdańsk)
IRENA SZUMIEL (Warszawa)

ADRES REDAKCJI

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

SPIS TREŚCI

CONTENTS

Profesor Tadeusz Korzybski — Wspomnienia

Professor Tadeusz Korzybski — Obituary
.....

Eukariotyczne i archebakteryjne białka opiekuńcze Cpn60 typu II

Eukaryotic and Archaeal Chaperonins of Group II

JERZY OSIPIUK 94

Zjawisko zwijania łańcucha polipeptydowego białek

Folding of the polypeptide chain

EDWARD A. CZURYŁO 101

Katepsyna B a proces inwazji nowotworowej

Cathepsin B and cancer invasion

WOJCIECH PORĘBA, KATARZYNA GAWLIK, JAN GUTOWICZ 111

Molekularne podstawy działania arsenu w komórkach białaczki promielocytowej

Molecular base of arsenic action in promyelocytic leukemia
cells

ROBERT WYSOCKI, EWA WIŚNIEWSKA 121

Rola jądrowych białek wiążących się z 7-metyloguanozyną na końcu 5' RNA

The role of nuclear proteins that bind to 7-methylguanosine at
the 5' end of RNA

MACIEJ KMIECIAK, ARTUR JARMOŁOWSKI 131

Powstawanie i funkcje białek wirusa zapalenia wątroby typu C

Processing and functions of hepatitis C virus

MAŁGORZATA SIDORKIEWICZ 143

Sprawozdanie z XXXVII Zjazdu Polskiego Towarzystwa Bio- chemicznego, Toruń 10-14 września 2001 oraz Rezolucja z Walnego Zgromadzenia z dnia 13 września 2001

..... 151

Eukariotyczne i archebakteryjne białka opiekuńcze Cpn60 typu II

Eukaryotic and Archaeal Chaperonins of Group II

JERZY OSIPIUK

Spis treści:

- I. Wprowadzenie
- II. Budowa białek opiekuńczych Cpn60 typu II
- III. Mechanizm zwijania białek przez białka opiekuńcze Cpn60
- IV. Specyfika wyboru substratów przez białka opiekuńcze Cpn60 typu II
- V. Rozwój ewolucyjny białek opiekuńczych Cpn60 typu II

I. Wprowadzenie

Białka opiekuńcze, zwane też czaperonami (ang. *chaperones*, prace przeglądowe: [1, 2]), są uważane za białka niezbędne w każdym żywym organizmie. Główną rolą tych białek jest zapobieganie niepożądanym oddziaływaniom między niewłaściwie zwiniętymi białkami i wspomaganie właściwego zwijania białek. Tylko niektóre białka wykazują zdolność samoistnego zwijania, czyli przyjmowania biologicznie aktywnej struktury przestrzennej. W warunkach naturalnych wpływ na przebieg zwijania białek mają również zmiany temperatury, skład środowiska drobnocząsteczkowego jak i niespecyficzne oddziaływanie z białkami występującymi w wysokich stężeniach wewnątrz komórek. Oprócz pomocy w poprawnym zwijaniu białek, białka opiekuńcze pełnią rolę również w ochronie białek przed czynnikami stresowymi, uczestniczą w ich transporcie między organellami komórkowymi, a także w degradacji

Contents:

- I. Introduction
- II. Structure of chaperonins of the group II
- III. Mechanism of protein folding by chaperonins
- IV. Substrate specificity of chaperonins of the group II
- V. Evolutionary origins of chaperonins of the group II

niepożądanych białek. Te wszystkie procesy są bardzo ważne dla funkcjonowania żywych organizmów.

Prawidłowo zwinięte białka mają hydrofobowe reszty aminokwasowe umieszczone we wnętrzu swoich struktur. W przypadku białek nieprawidłowo zwiniętych i nowosyntetyzowanych, reszty hydrofobowe występują na ich powierzchni. Białka opiekuńcze rozpoznają wyeksponowane reszty hydrofobowe i oddziałują z nimi. Stabilizuje to strukturę białek-substratów, chroni je przed agregacją i izoluje od otoczenia. Taka sytuacja sprzyja prawidłowemu przebiegowi zwijania białek. W skrócie, działanie białek opiekuńczych polega na zapewnieniu czasu i warunków do niezakłóconego i właściwego zwinięcia białek według zasad termodynamiki. Wspomniany powyżej mechanizm działania białek opiekuńczych charakteryzuje się szerokim spektrum substratów. Z tego względu białka opiekuńcze nie mogą być uważane za enzymy w klasycznym znaczeniu, według którego powinny one wykazywać dużą specyficzność katalizowanej reakcji, jak i doboru substratów. Ponadto należy zaznaczyć, że wynikiem działania białek opiekuńczych nie jest przeprowadzenie określonej reakcji chemicznej, a jedynie zmiana struktury przestrzennej substratu, która nadaje aktywność biologiczną nowosyntetyzowanym białkom i przywraca

tę aktywność w przypadku nieprawidłowo zwiniętych substratów.

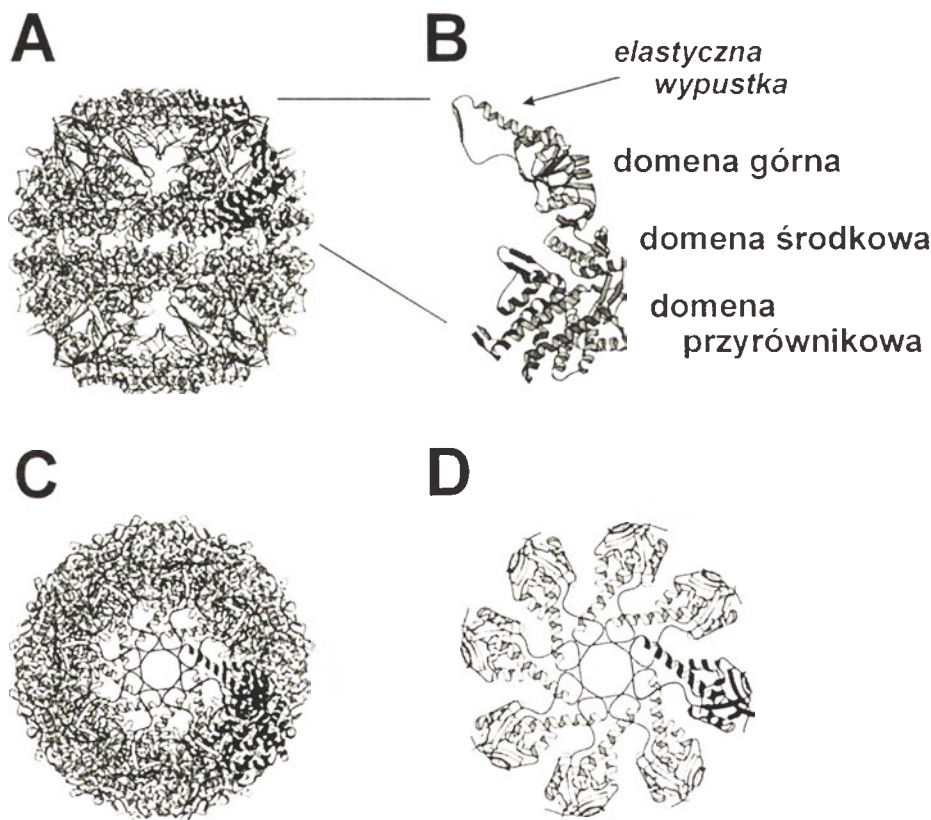
Białka opiekuńcze dzielimy na rodziny według ich masy. Jedną z rodzin białek opiekuńczych są białka Cpn60 (ang. *chaperonins*, prace przeglądowe: [3, 4]) zbudowane z merów o masie około 60 kDa. Wykazano, że białka te są nieodzowne do poprawnego zwijania innych białek we wszystkich temperaturach.

II. Budowa białek opiekuńczych Cpn60 typu II

Białka Cpn60 mają charakterystyczną postać cylindra złożonego z dwóch połączonych pierścieni (Ryc. 1A, B). Każdy z tych pierścieni zawiera wewnętrzną komorę zdolną pomieścić białka o masie do 60 kDa [5, 6] i stwarzającą warunki sprzyjające zwijaniu białek. Rozróżniamy dwie podgrupy białek

na podwyższenie temperatury powyżej wartości fizjologicznej. Jest ono również określane jako Hsp60 (ang. *heat shock protein*). Głównym kofaktorem tego białka jest inne białko szoku termicznego, białko GroES (Hsp10), występujące w formie pierścienia składającego się z siedmiu podjednostek o masie 10 kDa każdy.

Białka Cpn60 typu II, będące tematem tej publikacji, są białkami opiekuńczymi występującymi w archebakteriach i w cytosolu organizmów eukariotycznych. Białka te noszą wiele nazw, jak: TF55 lub termosom (ang. *thermosome*) w przypadku archebakterii oraz C-cpn (cytosolowe białko Cpn), TCP-1 (ang. *t-complex polypeptide*), TRiC (ang. *TCP-1 ring complex*) i CCT (ang. *chaperonin containing TCP-1*) w przypadku białek eukariotycznego cytosolu. W niektórych organizmach, jak np. w archebakteriach *Methanococcus jannashii*, białka tej podgrupy tworzą kompleksy złożone z jednakowych monomerów



Ryc. 1. Budowa białek Cpn60 typu II opracowana na podstawie struktury atomowej białka termosomu z *Thermoplasma acidophilum* w formie zamkniętej (forma odpowiadająca Ryc. 2 E i F). Rycinę wykonano przy pomocy programu Molscript [46] na podstawie współrzędnych 1A6D.pdb. A) Widok boczny pokazujący podwójny pierścień białka. Jeden z 14 monomerów białka został wytłuszczony. B) Domenowa budowa podjednostek białek Cpn60. C) Widok z góry na cząsteczkę białka Cpn60. D) Widok z góry na domenę szczytową w jednym z pierścieni białka Cpn60.

Cpn60. Pierwszą z nich tworzą białka określane jako białka Cpn60 typu I, które występują w bakteriach oraz eukariotycznych mitochondriach i chloroplastach. Przykładem białka z tej podgrupy jest białko GroEL z bakterii *Escherichia coli* [7-9], złożone z 14 jednakowych podjednostek o masie 57 kDa każda. Jest to białko szoku termicznego, co oznacza, że jego ilość w komórkach znacznie wzrasta w odpowiedzi

[10]. Jednakże, najczęściej białka te składają się z 16 podjednostek, po 8 podjednostek w każdym z pierścieni. Wyjątek stanowi białko TF55 z archebakterii *Sulfolobus*, które składa się z 2 pierścieni po 9 podjednostek [12-14]. Organizacja podjednostek w pierścieniach nie jest przypadkowa. Każdy pierścień eukariotycznych białek Cpn60 typu II zawiera po jednej z 8 różnych podjednostek o masach 55-60 kDa w

ściśle określonym porządku [11, 15]. W białkach archebakteryjnych zwykle występują 2 rodzaje podjednostek, które są ułożone naprzemiennie [4, 16]. Jak dotąd nie wyjaśniono organizacji struktury białek Cpn60 z archebakterii *Sulfolobus*. Zbudowane są one z 2 pierścieni zawierających po 9 monomerów 3 różnych podjednostek. Można przypuszczać, że występuje w nich określone uszeregowanie 3 różnych podjednostek, które jest trzykrotnie powtórzone w każdym z pierścieni.

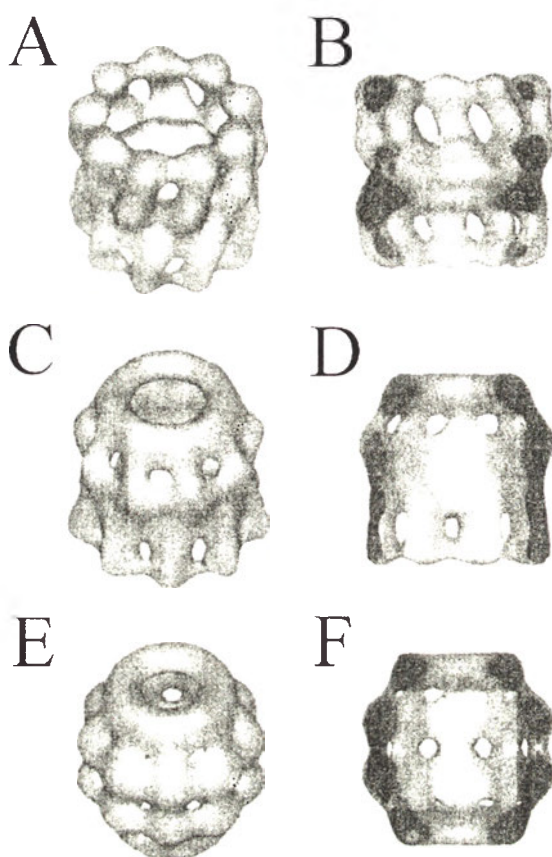
Z białkami Cpn60 typu II oddziałują białka opiekuńcze GimC (znane również jako ang. *prefoldin*) [17-20]. Nie zawierają one elementów homologicznych znanych białek bakteryjnych. Substratami obu białek opiekuńczych, Cpn60 i GimC, jest wiele białek cytosolowych, jednakże dominującą grupę substratów stanowią aktyny i tubuliny, będące głównymi składnikami eukariotycznego cytoszkieletu [5].

Struktura podjednostek białek Cpn60 na poziomie atomowym została dokładnie poznana na podstawie badań krystalograficznych białek GroEL z bakterii *Escherichia coli* [7, 9] i termosomu z archebakterii *Thermoplasma acidophilum* (Ryc. 1) [16]. Wykazały one podobną konstrukcję pojedynczych podjednostek składających się z trzech domen: szczytowej (ang. *apical*), łącznikowej (ang. *intermediate*) i równikowej (ang. *equatorial*) (Ryc. 1B). Domena równikowa odpowiada za większość oddziaływań wewnątrz pierścieni białek Cpn60, jak i pomiędzy nimi. Na górnej powierzchni tej domeny po wewnętrznej stronie komór białka i w pobliżu domeny łącznikowej znajduje się miejsce wiązania ATP, którego hydroliza jest niezbędna do aktywności białka opiekuńczego. Domena szczytowa służy do wiązania substratów i podlega znacznym zmianom konformacji podczas zwiwania białek-substratów. Struktura przestrzenna obu typów białek Cpn60 jest niemal identyczna. Różnią się one głównie obecnością elastycznej wypustki złożonej z 33 aminokwasów i znajdującej się w szczytowej domenie białek typu II (Ryc. 1B) [16]. Wypustka ta prawdopodobnie zastępuje białko GroES, które ma za zadanie zamykanie komory białka GroEL gdy wewnątrz znajduje się substrat.

III. Mechanizm zwiwania białek przez białka opiekuńcze Cpn60

Na podstawie badań krystalograficznych i mikroskopii elektronowej w niskich temperaturach udało się wykryć 3 formy konformacyjne białek Cpn60 [22-24]. Są to forma otwarta, otwarto-zamknięta (w

formie pocisku) i zamknięta (Ryc.2). W znaczącym stopniu przypominają one konformacje białka GroEL [9, 25]. Zatem przypuszcza się, że forma otwarta



Ryc. 2. Rekonstrukcja struktury cząsteczki białka Cpn60 na podstawie wyników badań za pomocą mikroskopii elektronowej w niskich temperaturach. A) i B) — formy otwarte, C) i D) — formy otwarto-zamknięte, E) i F) — formy zamknięte. Ryciny A, C i E pokazują rekonstrukcje białka w rzucie ukośnym akcentującym zmianę wymiarów otworu komory białka Cpn60 (rycina A względem E). Ryciny B, D i F przedstawiają przekroje rekonstrukcji cząsteczki białka. Reprodukacja została wykonana za zgodą dr Helen R. Saibil [20].

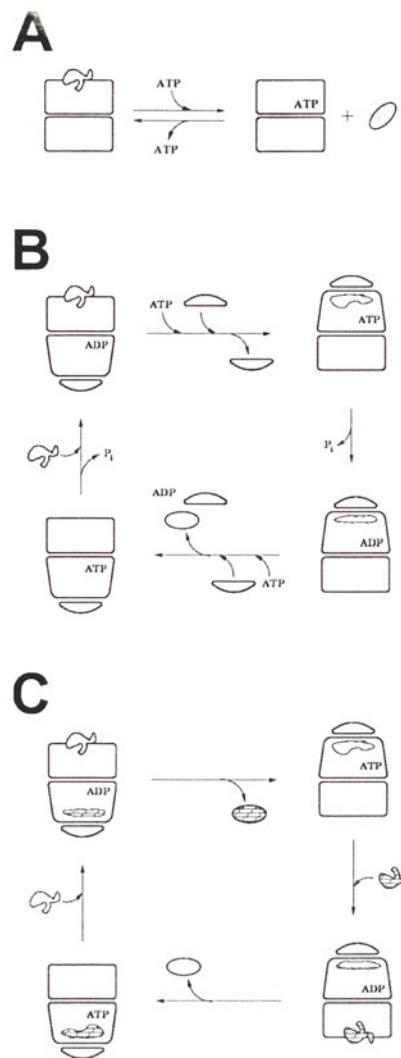
odpowiada białkom Cpn60 bez związanego nukleotydu. Otwór wejściowy do komór białka w tej formie jest znacznie rozszerzony, co ułatwia przyłączenie substratu mającego ulec zwiwaniu. Forma zamknięta zaś jest białkiem ze związanymi nukleotydami i może zawierać substrat wewnątrz komór. Forma otwarto-zamknięta jest formą pośrednią. Występuje w niej jeden pierścień ze związanymi nukleotydami, a drugi bez nukleotydów. Prawdopodobnie jest to forma aktywna w procesie zwiwania białek *in vivo* [24].

Działanie białka GroEL jako białka opiekuńczego zostało stosunkowo dokładnie poznane. Formą akceptorową, czyli formą wiążącą substraty, jest GroEL bez związanego nukleotydu bądź ze związanym

ADP (Ryc.3A) [26, 27]. Białka o nieprawidłowej konformacji zwykle wykazują wyeksponowane hydrofobowe reszty aminokwasowe, które przyłączają się do hydrofobowych reszt aminokwasowych znajdujących się przy otworze komór w domenach szczytowych białka GroEL. Przyłączenie ATP do pierścienia GroEL ze związanym substratem powoduje uwolnienie substratu (Ryc.3A). Często ten typ reakcji lub kilkakrotne jej powtórzenie wystarcza aby substrat przyjął formę natywną [26, 27].

Zaobserwowano również bardziej złożony proces zwijania białek przez GroEL, który jest przedstawiony na rycinie 3B [28]. W tym przypadku substrat przyłącza się do kompleksu GroEL/GroES/ADP od strony pierścienia GroEL nie mającego związanego białka GroES. Następnie, białko GroES i ATP przyłączają się do pierścienia GroEL ze związanym substratem. Powoduje to zamknięcie otworu komory z substratem i przesunięcie substratu w głąb komory, gdzie na skutek zmian konformacyjnych odsłaniają się hydrofilowe reszty aminokwasowe białka GroEL sprzyjające prawidłowemu zwijaniu białek. W wyniku obrotu domen szczytowych o 90° wokół ich głównej osi (przebiegającej od podstawy domen do ich wierzchołka) i odchylenia o 60° od osi pierścienia, hydrofobowe reszty aminokwasowe wcześniej wiążące substrat uczestniczą w wiązaniu białka GroES [9, 28]. Te zmiany przestrzenne odpowiadają przekształceniu białka GroEL z formy otwartej do formy zamkniętej. Zakończenie cyklu następuje po hydrolizie ATP, która powoduje odłączenie białka GroES od białka GroEL i uwolnienie substratu z komory czapekronin. Przemiany te umożliwiają przyłączenie GroES i ATP do przeciwległego pierścienia GroEL. Czas hydrolizy ATP, wynoszący w tej reakcji około 15 sekund [2], daje cząsteczce białka możliwość przyjęcia poprawnej konformacji w czasie, gdy pozostaje ono wewnątrz komory GroEL. Po kolejnej hydrolizie ATP, ewentualnie po odłączeniu ATP i następnie przyłączeniu ADP, białko GroEL jest gotowe do przyjęcia następnego substratu. W przypadku wielkości substratów, opisany powyżej cykl zwijania musi być wielokrotnie powtórzony aby zwijane białko przyjęło prawidłową konformację [28, 29].

Jest bardzo prawdopodobne, że dwie komory białka GroEL mogą pracować jednocześnie, gdy każda z nich uczestniczy w innym etapie procesu zwijania (Ryc. 3C). W sytuacji gdy po hydrolizie ATP do ADP zwinięty substrat pozostaje jeszcze w komorze, przeciwległy pierścień GroEL jest w stanie związać następny substrat. Tak zapoczątkowana akcja białka GroEL pozwala na przebieg zsynchronizowanych



Ryc. 3. Schemat objaśniający działanie białka opiekuńczego GroEL.

A) Schemat zwijania białek poprzez cykle wiązania i uwalniania substratu spowodowanego wiązaniem ATP przez GroEL. B) Schemat zwijania białek wewnątrz komór białka GroEL wykorzystujący kompleks białkowy GroEL-GroES i hydrolizę ATP. Kompleks GroEL-GroES-ADP jest akceptorem nieprawidłowo zwiniętych białek. Po przyłączeniu substratu, komora białka GroEL jest zamykana przez białko GroES. Uwolnienie substratu z komory następuje po odłączeniu się białka GroES spowodowanego hydrolizą ATP. C) Schemat zwijania białek wykorzystujący jednocześnie obie komory białka GroEL. Oba cykle zwijania substratów przebiegają jednocześnie, jednakże na innych etapach procesu wg schematu analogicznego do pokazanego na rysunku B. W celu uzyskania przejrzystości, opis procesu zwijania białek został uproszczony w porównaniu do rysunku B.

cykliów zwijania białek jednocześnie w obu komorach GroEL [28].

Pomimo szeregu prac dotyczących zwijania białek przez białka Cpn60 typu II [22-24, 30-32], jak dotąd nie udało się w pełni opisać tego procesu. Większość doniesień wykazało znaczne podobieństwo mechanizmów działania białek Cpn60 typu II oraz białka GroEL. Główną różnicą jest obecność elastycznej wypustki w białkach typu II, która zamyka komory białek Cpn60 typu II i zastępuje białko GroES [23]. Poza tym zaobserwowano mniejsze skręce-

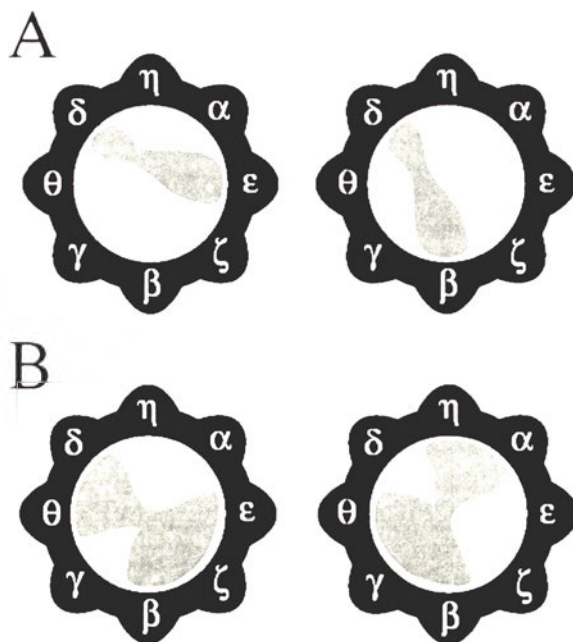
nie domen szczytowych tych białek w porównaniu ze strukturą białka GroEL i wynosi ono około 40° dla obrotu wokół głównej osi domen i 30° dla odchylenia od osi pierścieni [15].

IV. Specyfika wyboru substratów przez białka opiekuńcze Cpn60 typu II

Początkowo uważano, że jedynymi substratami białek Cpn60 w eukariotycznym cytosolu są aktyny i tubuliny [4, 33, 34]. Jednakże niedawno wykazano, że 9-15% wszystkich nowosyntetyzowanych białek cytosolowych o masach w granicach 30-60 kDa ulega immunoprecypitacji wraz z białkami Cpn60 [5]. Wśród opisanych substratów były białka takie jak miozyna II, białka kapsydów wirusowych, białko supresorowe nowotworów Hippela-Landaua (VHL) i lucyferaza świetlików [4, 5, 35-37]. Żadne z tych białek nie występuje w prokariontach i jak dotąd nie stwierdzono by substraty te mogły być zwijane przez bakteryjne białka Cpn60. Sugeruje to możliwość, że jedynie eukariotyczne białka Cpn60 są w stanie wspomagać zwijanie substratów pochodzenia eukariotycznego.

Pomimo faktu oddziaływania eukariotycznych białek Cpn60 z wieloma substratami, to ich głównymi podmiotami działania są białka cytoszkieletu: aktyny i tubuliny. Białka te po utracie natywnej struktury mogą związać się samodzielnie w obecności samego ATP. Jednakże proces ten jest mało efektywny. Białko GroEL może wiązać nieaktywne formy aktyny β i tubuliny α , a następnie uwalniać je w reakcji zależnej od ATP. Uwalniane produkty nie są jednak prawidłowo zwinięte [38]. Inaczej jest w przypadku eukariotycznych białek Cpn60 typu II, które z pomocą swoich kofaktorów jak białko GimC, są zdolne do zwijania tubulin i aktyn. Jedynie w wyniku działania eukariotycznych białek opiekuńczych Cpn60 typu II, wspomniane substraty stają się w pełni aktywne biologicznie [4, 11].

Dokładnych informacji o charakterze oddziaływań eukariotycznych białek Cpn60 z substratami dostarczyły badania wykorzystujące mikroskopię elektronową w niskich temperaturach. Wykazały one, że aktyny α wiążą się do białek Cpn60 w pobliżu otworu ich komór w ściśle określony sposób. Mniejsza domena aktyn (zawierająca poddomeny I i II) wiąże się z podjednostką δ czaperonin zaś większa domena aktyn (zawierająca poddomeny III i IV) z podjednostką β lub ϵ (Ryc. 4A) [39, 40]. Analogiczne badania wykazały, że tubuliny wiążą się jednocześnie z 5 podjednostkami białek Cpn60 [41]. Wiązanie to zachodzi na większej powierzchni oddziałujących



Ryc. 4. Specyfika oddziaływania eukariotycznych białek Cpn60 z aktynymi (A) i tubulinami (B). Białka-substraty łączą się swoimi domenami w poprzek pierścienia z określonymi podjednostkami białka Cpn60. Powoduje to „rozciągnięcie” białek wewnątrz komór białka Cpn60, co ułatwia zwijanie się częściowo rozdzielonych domen substratu. Litera na obwodzie pierścienia odpowiadają nazwom podjednostek eukariotycznych białek Cpn60.

białek niż w przypadku wiązania z aktynymi i pokrywa obszar od podstawy domen szczytowych po elastyczną wypustkę. Poza tym zaobserwowano wyraźne zacieśnienie otworu komór w domenach szczytowych białek Cpn60 podczas wiązania tubulin, co nie występowało przy wiązaniu aktyn [39, 41]. Większa powierzchnia oddziaływań tubulin z białkami Cpn60 typu II, niż jest to w przypadku aktyn, świadczy o większej specyficy i sile oddziaływań. Może to oznaczać, że pierwotnie tubuliny były głównym substratem białek Cpn60, zaś aktyny dopiero później dostosowały się do istniejącego już aparatu białek opiekuńczych rodziny Cpn60. Immunoprecypitacja podjednostek białka Cpn60 ze związanymi tubulinami i znajomość budowy pierścienia białka ujawniły 2 formy oddziaływań tubulin (Ryc. 4B) [41]. Jednakże nie było możliwe określenie, czy obie formy oddziaływań występują podczas jednego cyklu zwijania tubulin czy też wynikają z faktu występowania dwóch rodzajów tubulin α i β . Obrazy uzyskane przy pomocy mikroskopii elektronowej sugerują mechanizm zwijania aktyn i tubulin. Oba rodzaje białek-substratów zbudowane są z dwóch domen i mogą ulec „rozciągnięciu” pomiędzy podjednostkami pierścienia białek Cpn60. W tej postaci domeny substratów rozłączają się i pozostają połączone jedynie poprzez wąski przegub łańcucha aminokwasowego

(Ryc. 4) [39, 41]. Ułatwia to zwijanie częściowo rozdzielonych domen substratów.

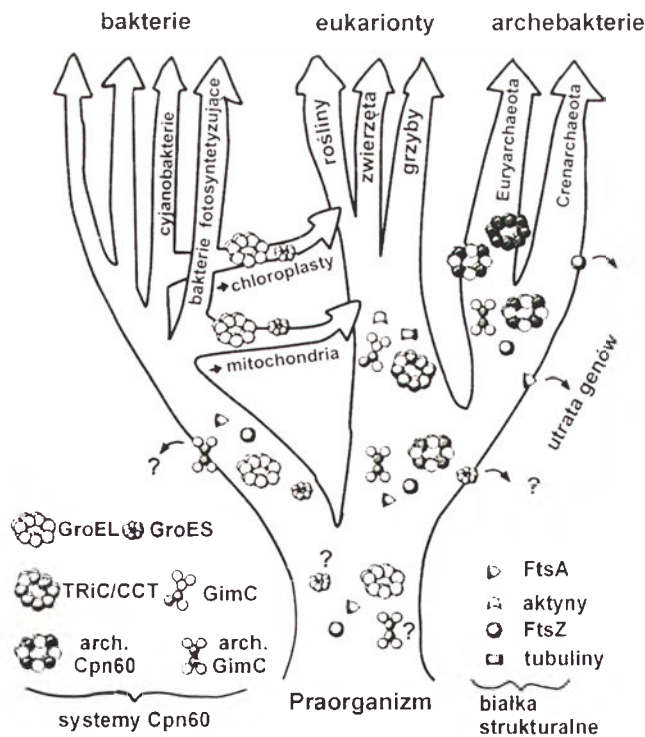
Jak dotąd, nie ustalono sposobu wyboru substratów przez archebakteryjne białka Cpn60. Wykazano występowanie części aktywności białek opiekuńczych tj. wiązanie niewłaściwie zwiniętych białek, ochronę przed czynnikami niszczącymi strukturę i opóźnianie ich spontanicznego zwijania [4]. Tylko w jednej pracy opisano aktywność zwijania substratów przez białka Cpn60 z archebakterii *Sulfolobus* [42]. Jedną z przyczyn takiej sytuacji są trudności z niszczeniem natywnej struktury archebakteryjnych białek-substratów, które są często białkami termofilnymi i wykazują dużą odporność na działanie typowych denaturantów. Ponadto jak dotąd nie znaleziono żadnych kofaktorów oddziałujących z archebakteryjnymi białkami Cpn60 (kofaktorów analogicznych do eukariotycznych białek wspomagających białka Cpn60 [4, 11]).

V. Rozwój ewolucyjny białek opiekuńczych Cpn60 typu II

Jedną z głównych cech odróżniających eukarionty od prokariontów jest cytoszkielet komórek eukario-

liny i keratyny. Jak wykazano, proces zwijania aktyn i tubulin wymaga udziału białek Cpn60 typu II [4, 11]. Jedynie w ten sposób aktyny i tubuliny mogą uzyskać swą aktywność biologiczną. Analiza sekwencji aminokwasowych aktyn i tubulin nie wykazała homologii z jakimkolwiek innym znanym białkiem bakteryjnym. Dopiero porównanie białkowych struktur przestrzennych, uzyskanych z badań rentgenograficznych kryształów białek, ujawniło podobieństwo aktyn i tubulin do bakteryjnych białek FtsA i FtsZ biorących udział w podziale komórek bakteryjnych [43, 44].

Uważa się, że białka opiekuńcze Cpn60 oraz białka prymitywnego cytoszkieletu współwystępowały w pierwszych organizmach eukariotycznych (Ryc. 5) [34]. Nawet u najbardziej prymitywnych eukariontów, jak *Giardia lamblia*, która nie zawiera mitochondriów, występuje cytoszkielet oraz białka Cpn60 składające się z 8 różnych podjednostek charakterystycznych dla eukariotycznego cytosolu [11, 45]. To samo dotyczy białka GimC, kofaktora białek Cpn60, składającego się w *Giardii* z 6 różnych podjednostek, tak jak u innych eukariontów [18, 45]. W przypadku archebakterii, gdzie nie stwierdzono występowania cytoszkieletu, białka Cpn60 występują



Ryc. 5. Hipotetyczny rozwój ewolucyjny i podział systemów białek opiekuńczych rodziny Cpn60 na tle ewolucji żywych organizmów w królestwach: bakterii, eukariontów i archebakterii. Białka u podstawy drzewa ewolucyjnego reprezentują przodków obecnych białek Cpn60, ich kofaktorów i białek strukturalnych. Strzałki pokazujące utratę genów przedstawiają braki białek w określonych królestwach. Alternatywne drogi ewolucji białek są oznaczone znakami zapytania np. albo wspólny przodek białek GimC ewoluował tylko w linii eukariotyczno-archebakteryjnej albo został on utracony w linii bakteryjnej. Rycina została wykonana na podstawie [34] za zgodą dr F. Ulricha Hartla. (na rycinie zastosowano skrót: arch. = archebakteryjne).

tycznych. Do jego zadań należą stabilizacja i zmiana kształtu komórek, transport organelli, segregacja chromosomów oraz skurcze mięśni. Głównymi białkami składowymi cytoszkieletu są aktyny, tubu-

najczęściej jako 16-mery złożone z dwóch różnych podjednostek, a białka GimC jako heksamery 2 różnych podjednostek [19]. Z tych faktów wysnuto wnioski, że białka Cpn60 i GimC zostały bardzo

wcześnie wykształcone w procesie ewolucji, prawdopodobnie jeszcze przed rozdzieleniem się królestw eukariontów i archebakterii (Ryc. 5) [34]. W późniejszym okresie oba białka ewoluowały we wzajemnej zależności od siebie, jednakże ewolucja ta przebiegła inaczej w każdym z królestw. Spowodowało to utworzenie dwóch wyraźnie różniących się systemów białek opiekuńczych w eukariontach i archebakteriach. Jest bardzo prawdopodobne, że przebieg procesów ewolucyjnych ukształtował eukariotyczne białka Cpn60 typu II jako kompleks składający się z 8 różnych podjednostek i dzięki temu wykazujący wysoce specyficzną aktywność zwijania białek cytoszkieletu [34].

Artykuł otrzymano 28 czerwca 2001
Zaakceptowano do druku 22 listopada 2001

Piśmiennictwo

- Grantcharova V, Alm E J, Baker D, Horwich A L (2001) *Curr Opin Struct Biol* **11**: 70-82
- Saibil H (2000) *Curr Opin Struct. Biol* **10**: 251-258
- Thirumalai D, Lorimer G H (2001) *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **30**: 245-69
- Gutsche I, Essen L-O, Baumeister W (1999) *J Mol Biol* **293**: 295-312
- Thulasiraman V, Yang C F, Frydman J (1999) *EMBO J* **18**: 85-95
- Houry W A, Frishman D, Eckerskorn C, Lottspeich F, Hartl F U (1999) *Nature* **402**: 147-154
- Braig K, Otwinowski Z, Hegde R, Boisvert D C, Joachimiak A, Horwich A L, Sigler P B (1994) *Nature* **371**: 578-586
- Chen S, Roseman A M, Hunter A, Wood S P, Burston S, Ranson N, Clarke A R, Saibil H R (1994) *Nature* **371**: 261-264
- Xu Z, Horwich A L, Sigler P B (1997) *Nature* **388**: 741-750
- Kowalski J M, Kelly R M, Konisky J, Clark D S, Wittrup K D (1998) *Syst Appl Microbiol* **21**: 173-178
- Willison K R (1999) W: Bukau B (red) *Molecular Chaperones and Folding Catalysts*. Harwood Academic, Amsterdam, str. 555-571
- Trent J, Nimmegern E, Wall J S, Hartl F-U, Horwich A L (1991) *Nature* **354**: 490-493
- Kagawa H K, Osipiuk J, Maltsev N, Overbeck R, Quate-Randall E, Joachimiak A, Trent J D (1995) *J Mol Biol* **253**: 712-725
- Archibald J M, Logsdon J M, Doolittle W F (1999) *Curr Biol* **9**: 1053-1056
- Liou A K, Willison K R (1997) *EMBO J* **16**: 4311-4316
- Ditzel L, Lowe J, Stock D, Stetter K O, Huber H, Huber R, Steinbacher S (1998) *Cell* **93**: 125-138
- Vainberg I E, Lewis S A, Rommelaere H, Ampe C, Vandekerckhove J, Klein H L, Cowan N J (1998) *Cell* **93**: 863-873
- Geissler S, Siegers K, Schiebel E (1998) *EMBO J* **17**: 952-966
- Leroux M R, Fändrich M, Klunker D, Siegers K, Lupas A N, Brown J R, Schiebel E, Dobson C M, Hartl F U (1999) *EMBO J* **18**: 6730-6743
- Siegers K, Waldmann T, Leroux M R, Grein K, Shevchenko A, Schiebel E, Hartl F U (1999) *EMBO J* **18**: 75-84
- Trent J D, Osipiuk J, Pinkau T (1990) *J Bacteriol* **172**: 1478-1482
- Schoehn G, Quate-Randall E, Jimenez J L, Joachimiak A, Saibil H R (2000) *J Mol Biol* **296**: 813-819
- Schoehn G, Hayes M, Cliff M, Clarke A R, Saibil H R (2000) *J Mol Biol* **301**: 323-332
- Llorca O, Smyth M G, Carrascosa J L, Willison K R, Radermacher M, Steinbacher S, Valpuesta J M (1999) *Nature Struct Biol* **6**: 639-642
- Roseman A M, Chen S, White H, Braig K, Saibil H R (1996) *Cell* **87**: 241-251
- Weissman J S, Kashi Y, Fenton W A, Horwich A L (1994) *Cell* **78**: 693-702
- Todd M J, Viitanen P V, Lorimer G H (1994) *Science* **265**: 659-666
- Rye H S, Roseman A M, Chen S, Furtak K, Fenton W A, Saibil H R, Horwich A L (1999) *Cell* **97**: 325-338
- Lorimer G H (1996) *FASEB J* **10**: 5-9
- Gutsche I, Mihalache O, Baumeister W (2000) *J Mol Biol* **300**: 187-196
- Gutsche I, Holzinger J, Roble M, Heumann H, Baumeister W, May R P (2000) *Curr Biol* **10**: 405-408
- Farr G W, Scharl E C, Schumacher R J, Sonddek S, Horwich A L (1997) *Cell* **89**: 927-937
- Hartl F U (1996) *Nature* **381**: 571-580.
- Leroux M R, Hartl F U (2000) *Curr Biol* **10**: R260-R264
- Feldman D E, Thulasiraman V, Ferreyra R G, Frydman J (1999) *Mol Cell* **4**: 1051-1061
- Srikakulam R, Winkelmann D A (1999) *J Biol Chem* **274**: 27265-27273
- Frydman J, Nimmegern E, Erdjument-Bromage H, Wall J S, Tempst P, Hartl U F (1994) *Nature* **370**: 111-117
- Tian G, Vainberg I E, Tap W D, Lewis S A, Cowan N J (1995) *Nature* **375**: 250-253
- Llorca O, McCormack E A, Hynes G, Grantham J, Cordell J, Carrascosa J L, Willison K R, Fernandez J J, Valpuesta J M (1999) *Nature* **402**: 693-696
- Rommelaere H, De Neve M, Melki R, Vandekerckhove J, Ampe C (1999) *Biochemistry* **38**: 3246-3257
- Llorca O, Martin-Benito J, Ritco-Vonsovici M, Grantham J, Hynes G M, Willison K R, Carrascosa J L, Valpuesta J M (2000) *EMBO J* **19**: 5971-5979
- Guagliardi A, Cerchia L, Bartolucci S, Rossi M (1994) *Protein Sci* **3**: 1436-1443
- Doolittle R F (1995) *Phil Trans Roy Soc Lond [Biol]* **349**: 235-240
- Lowe J, Amos L A (1998) *Nature* **391**: 203-206
- Archibald J M, Logsdon J M, Doolittle W F (2000) *Mol Biol Evol* **17**: 1456-1466
- Kraulis P J (1991) *J Appl Cryst* **24**: 946-950

Zjawisko zwijania łańcucha polipeptydowego białek

Folding of the polypeptide chain

EDWARD A. CZURYŁO

Spis treści:

- I. Wprowadzenie
- II. Proces zwijania białek
- III. Energetyka procesu zwijania białka
- IV. Schematy opisujące zwijanie łańcucha białkowego
- V. Drogi zwijania białek
- VI. Rodziny białek opiekuńczych (chaperonów)
- VII. Zakończenie

Wykaz stosowanych skrótów: BPTI — inhibitor trypsyny z trzustki wołowej; BSE — encefalopatia gąbczasta bydła; EGF — epidermalny czynnik wzrostu; PDI — (ang. *protein disulphide isomerases*) izomerazy dwusiarczkowe białek; PPIazy — (ang. *peptidyl prolyl isomerases*) peptydyloprolylowe izomerazy

I. Wprowadzenie

Na początku lat 60-tych ubiegłego wieku Anfinsen [1] wykazał, że aktywność biologiczna białka nierozzerwalnie związana jest z odpowiednią strukturą przestrzenną jego cząsteczek (współczesne poglądy w pracy przeglądowej [2]). Strukturę taką cząsteczka przyjmuje spontanicznie (nawet w przypadku zredukowania wszystkich jej wewnętrznych mostków dwusiarczkowych), przeto uważa się ją za strukturę natywną. Proces jej formowania określa się skrótowo, jako zjawisko zwijania białka (łańcucha polipeptydowego).

Na początku lat 70-tych do opisu procesu zwijania struktury natywnej białka, w literaturze angielskiej, Anfinsen [3, 4] zaproponował termin „*protein folding*”, a dla procesu odwrotnego — rozwijania struktury „*protein unfolding*”. Ten ostatni termin oznacza odwracalne niszczenie struktury białka i jest odróżniany od terminu „*denaturation*”, który oznacza nieodwracalne zniszczenie struktury białka naj-

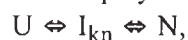
Contents:

- I. Introduction
- II. Protein folding process
- III. The energetic effects of protein folding process
- IV. Protein folding models
- V. Protein folding pathways
- VI. Chaperone families
- VII. Conclusion

częściej związane również z agregacją i wypadaniem osadu białek (w komórce tworzeniem się złożeń białkowych). Terminologia zaproponowana przez Anfinsena szybko zyskała powszechną akceptację, na co niewątpliwie miało wpływ przyznanie mu w 1972 roku Nagrody Nobla za osiągnięcia w dziedzinie badań strukturalnych białek.

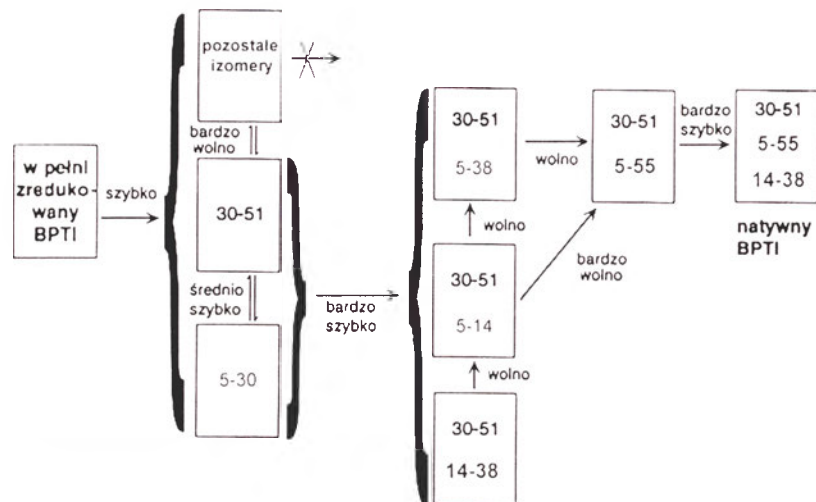
II. Proces zwijania białek

Pierwsze doświadczenia wykazały, że proces zwijania struktury białka jest procesem spontanicznym i bardzo szybkim, jeśli uwzględnić wielkość cząsteczek białkowych, które w tej reakcji uczestniczą. Początkowo sądzono nawet, że jest to proces przejścia pomiędzy dwoma możliwymi stanami strukturalnymi ($U \rightleftharpoons N$): stanem całkowicie rozwiniętym (często mylnie utożsamianym z konformacją kłęбка statystycznego) i strukturą natywną [5-7]. Stany te, w określonych warunkach, są stabilne, więc można je charakteryzować na wiele sposobów zależnie od dostępności metod pomiarowych. Podsumowanie pierwszego okresu badań przejść (zmian) strukturalnych w białkach można znaleźć w pracach przeglądowych [8-10]. Znacznie trudniej powiedzieć coś o drodze, po jakiej odbywa się proces zwijania struktury. Badania kinetyki procesu zwijania i rozwijania struktury łańcucha białkowego pozwoliły stwierdzić, że proces ten często odbywa się za pośrednictwem stanów pośrednich, a nawet, że różne cząsteczki mogą wybierać różne drogi zwijania [11]. Zatem proces taki można opisywać układem przejść:



Dr hab.; Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego, ul. Pasteura 3, 02-093 W-wa, tel. 659-85-71, wew. 229; e-mail: eczurylo@nencki.gov.pl

gdzie wskaźniki oznaczają odpowiednio drogę, po której odbywa się zwijanie i stan pośredni, przez który proces ten przechodzi na rozpatrywanej drodze. Jako przykład wielotorowości procesu zwijania można przytoczyć proces odtwarzania mostków dwusiarczkowych w cząsteczce inhibitora trypsynowego z trzustki wołowej [12-18], BPTI (Ryc.1). Dowol-



Ryc. 1. Drogi zwijania łańcucha cząsteczek inhibitora trypsynowego z trzustki wołowej (BPTI) opracowane na podstawie prac cytowanych w tekście. Liczbami, pisanymi czcionką pogrubioną, zaznaczono numery reszt cysteinowych tworzących mostki dwusiarczkowe występujące w strukturze natywnej, a liczbami, pisanymi czcionką zwykłą, zaznaczono mostki nie występujące w strukturze natywnej cząsteczek inhibitora. Podano też względne szybkości przejść pomiędzy poszczególnymi izoformami strukturalnymi inhibitora.

ność wyboru drogi widać już na etapie formowania pierwszego mostka dwusiarczkowego. Około 70% cząsteczek inhibitora tworzy pierwszy mostek (pomiędzy Cys30 i Cys51), który występuje w strukturze natywnej i prowadzi do powstania prawidłowej ich struktury. Natomiast około 20% cząsteczek inhibitora jako pierwszy tworzy mostek (pomiędzy Cys5 i Cys30), który wprawdzie nie występuje w strukturze natywnej, ale pozwala dojść do niej. Pozostałe 10% cząsteczek inhibitora, jako pierwszy mostek dwusiarczkowy, tworzy mostki inne od wymienionych, a żaden z nich nie pozwala cząsteczce zwinąć się w strukturę natywną, jednakże po ich rozerwaniu cząsteczki te mogą powrócić na jedną z dwu dróg prowadzących do celu. Na etapie formowania drugiego mostka dwusiarczkowego cząsteczki inhibitora mogą wybrać jedną z trzech izoform, w których posiadają po jednym mostku właściwym i jednym niewłaściwym (patrz Ryc. 1), a izoformy te pozwalają na dalsze prawidłowe zwijanie cząsteczek inhibitora.

III. Energetyka procesu zwijania białka

Struktura natywna zależy od wielu parametrów fizykochemicznych, takich jak: temperatura, siła jono-

wa roztworu i jego pH, a czasem obecność jonów metali dwuwartościowych, cząsteczek organicznych lub grup prostetycznych (np. hemu). Dlatego opisując teoretycznie proces zwijania białka musimy uwzględniać wszystkie te parametry, czyli opisywać ten proces w przestrzeni wielowymiarowej, dlatego też często mówimy, że odbywa się on na wielowy-

miarowej hiperpowierzchni energetycznej. Zgodnie z prawami fizyki każda cząsteczka stara się przyjąć możliwie najmniejszą energię swobodną, a tak się składa, że struktura natywna jest stabilną strukturą i odpowiada jej, jeśli nie najniższa, to bliska najniższej energii [19-24].

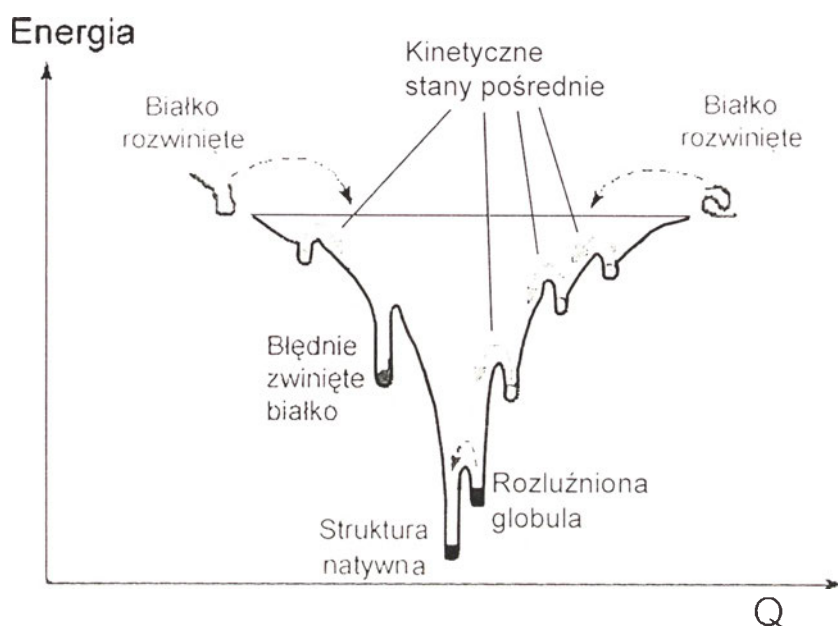
Polipeptydowy łańcuch białka można rozpatrywać jako kopolimer płaskich grup peptydowych poprzedzielany atomami węgla (oznaczonego C^α), od którego odchodzą tzw. łańcuchy boczne, lub homopolimer tzw. jednostek peptydowych. Wiązania pomiędzy grupami peptydowymi i wspomnianymi atomami węgla C^α są wiązaniami pojedynczymi, wokół których możliwa jest ograniczona rotacja. To powoduje, że nawet stosunkowo krótkie łańcuchy białkowe mogą przyjąć bardzo dużo różnych konformacji. Jeśli założyć, że w procesie zwijania sprawdzane są wszystkie konformacje, to dla małego białka (o długości łańcucha rzędu 100 reszt, i przy możliwie najkrótszym czasie zmiany konformacji rzędu 10⁻¹¹ s) proces zwijania trwałby dłużej niż istnienie wszechświat. Jest to tzw. paradoks Levinthala [25], który przekonuje nas o tym, że zwijanie białka odbywa się nie na drodze statystycznego przeszukiwania jego przestrzeni konformacyjnej (wszystkich dozwolonych konformacji), a na ściśle określonej,

krótkiej drodze za pośrednictwem stanów pośrednich (Ryc. 2).

Hiperpowierzchnię energetyczną i leżącą na niej drogę, po której zwija się białko, można obrazowo przedstawić jako wewnętrzną, chropowatą powierzchnię lejka [26, 27], którego przekrój pokazany jest na Ryc. 2. Szerokość lejka jest proporcjonalna do ilości dostępnych konformacji, dla rozpatrywanej cząsteczki, o zadanej wartości energii swobodnej. W miarę jak coraz większa część reszt aminokwasowych cząsteczki białkowej przyjmuje konformację

strukturze rozluźnionej globuli [28-33]. Energia swobodna odpowiadająca strukturze rozluźnionej globuli jest niska i tylko nieznacznie wyższa od energii odpowiadającej strukturze natywnej (patrz Ryc. 2).

Badania przejść strukturalnych prowadzone są zazwyczaj na małych białkach o jednodomenowej strukturze, ponieważ wtedy łatwiejsza jest interpretacja wyników. Jeśli domena jest niekompletna, to białko może nie osiągnąć stabilnej struktury zbliżonej do struktury natywnej (np. rybonukleaza A po-



Ryc. 2. Zależność energii swobodnej od uogólnionej współrzędnej (Q) opisującej proces zwijania białka za pomocą tzw. hipotezy lejka. Na rysunku zaznaczono lokalne minima energii, które odpowiadają kinetycznym stanom pośrednim, strukturze rozluźnionej globuli i błędnie zwiniętej cząsteczce białkowej. Zaznaczono też globalne minimum odpowiadające strukturze natywnej.

natywną, liczba dostępnych konformacji szybko maleje. Zmniejsza się entropia układu. W końcu dochodzimy do jednej możliwej struktury (konformacji) i to jest właśnie struktura natywna położona w najniższej części lejka. Żeby być w zgodzie z prawami fizyki należy powiedzieć, że każdy atom wchodzący w skład makrocząsteczki białkowej ma określoną swobodę drgań wokół swego położenia równowagowego, a więc cała makrocząsteczka ma wiele zbliżonych do siebie struktur. Zatem struktura natywna jest strukturą uśrednioną i opisywaną przez równowagowe ułożenie wszystkich atomów makrocząsteczki.

Proces zwijania białka jest szybki w porównaniu z dostępnymi metodami obserwacji, a stany pośrednie są niestabilne, krótkotrwałe. Jednakże w przypadku niektórych białek osiągalny jest stabilny stan pośredni, który zwany jest stanem rozluźnionej globuli (ang. *molten globule*). Ponieważ jest to stan stabilny i łatwy do obserwacji, więc często mówimy wręcz o

zbawiona czterech reszt z końca C [34] lub α -laktalbumina pozbawiona swej subdomeny β -strukturalnej [35]). Większe białka mogą tworzyć wielodomenowe struktury, w których poszczególne domeny mogą zwijać się niezależnie od siebie, z różnymi szybkościami [36], a czasem domeny są połączone giętkimi fragmentami łańcucha (łącznikami) [37]. Wszystko to utrudnia interpretację uzyskiwanych wyników pomiarów. Stąd, dalsze rozważania ograniczymy właśnie do białek jednodomenowych lub takich, w których przejścia strukturalne we wszystkich domenach odbywają się równocześnie i/lub są wzajemnie zależne.

IV. Schematy opisujące zwijanie łańcucha białkowego

Wiele schematów zostało zaproponowanych do opisu procesu zwijania białek, a często różni autorzy tym samym terminom przypisują inne znaczenie,

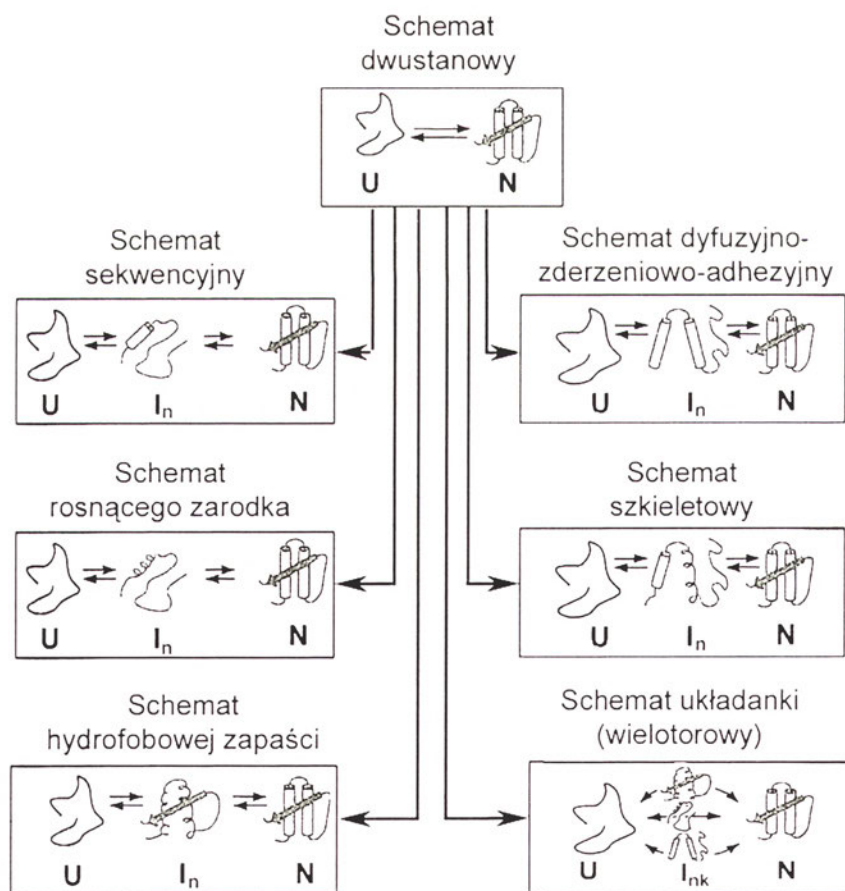
szersze opisy można znaleźć w pracach przeglądowych [38-44].

Pierwszym pomyślnie zastosowanym schematem zwijania/rozwijania białek był dwustanowy schemat [5], który był prostą konsekwencją obserwacji Anfinsena [1], a wszystkie następne schematy to jego kolejne rozwinięcie (patrz Ryc. 3).

Białka, których cząsteczki zwijane są po jednej drodze można opisać schematem sekwencyjnym ($U \Leftrightarrow I_1 \Leftrightarrow \dots \Leftrightarrow I_n \Leftrightarrow N$) [45, 46], którego szersze omówienie podano w pracach przeglądowych [38, 47]. Przechodzą one przez kolejne stany pośrednie, w których przyjmują ściśle określone, jednakowe na danym etapie struktury.

Jeśli pierwsze przejście ($U \Leftrightarrow I_1$) w powyższym schemacie charakteryzuje się długim czasem przejścia (trwa długo), a pozostałe przejścia odbywają się szybko, to mówimy o schemacie rosnącego zarodka. W pierwszym etapie, który jest decydujący dla całego procesu, musi nagromadzić się odpowiednia liczba molekuł, aby proces był obserwowalny. Nale-

ku szeroko dyskutowano nad hipotezą traktującą resztę prolinową jako jądro (zarodek), od którego rozpoczyna się proces zwijania łańcucha białkowego [51-56]. Hipoteza rosnącego zarodka, zaproponowana przez Brantisa ze współpracownikami [57], przeceniała rolę reszty prolinowej. Na przykład, w cząsteczce rybonukleazy A dwie z czterech reszt proliny występują w konformacji *cis*, a w sąsiedztwie obu w konfiguracji *cis* występują reszty tyrozyny [58, 59]. Dodge i Scheraga [60] wykazali, że zastąpienie, w wyniku punktowej mutacji w cząsteczce rybonukleazy A, reszty Pro występującej w konfiguracji *cis* resztą alaninową powoduje, że reszta alaninowa zmienia swą najczęściej spotykaną konfigurację *trans* na *cis*, a zastąpienie reszty Pro występującej w konfiguracji *trans* resztą alaninową nie zmienia jej normalnie spotykanej konfiguracji. Zatem konfiguracja *cis* jest wymuszana na każdej reszcie aminokwasowej, która znajdzie się w tym miejscu łańcucha polipeptydowego, ponieważ dla lokalnej struktury jest to energetycznie najkorzystniej-



Ryc. 3. Schematy stosowane w kinetycznych opisach zwijania łańcuchów różnych białek (szczegóły w tekście).

ży podkreślić, że mówiąc o jądrze (zarodku) struktury myślimy o małym elemencie strukturalnym, a w całym rozważaniu ważna jest tylko kinetyka procesu [48-50]. W latach osiemdziesiątych minionego wie-

sza konfiguracja. Należy natomiast podkreślić, że w wielu łańcuchach białkowych osobliwe, w porównaniu z pozostałymi aminokwasami, możliwości zmian konformacyjnych reszty prolinowej są wykorzysty-

wane (patrz w pracy przeglądowej [61]). Znane są przypadki, że w sąsiedztwie reszty prolinowej na innych resztach mainokwasowych też może być wymuszana konfiguracji *cis* [61, 62].

W schematach dyfuzyjno-zderzeniowo-adhezyjnym i szkieletowym nie nakładamy żadnych ograniczeń (warunków) na kolejne stany pośrednie. Liczebność stanu przejściowego zależy od szybkości przejść. W pierwszym przypadku podkreśla się procesy dyfuzji elementów struktury drugorzędowej, która doprowadza do efektywnych ich zderzeń, a w konsekwencji do przebudowy lokalnej struktury jakiegoś fragmentu cząsteczki (np. adhezji) [63, 64]. W drugiej hipotezie proces dyfuzji elementów strukturalnych jest etapem limitującym zwijanie struktury. W tym przypadku zakłada się obecność kolekcji elementów struktury drugorzędowej o określonej wewnętrznej stabilności, które wejdą w skład struktury natywnej [65-67]. Łączenie i dopasowanie (ang. *docking*) tych struktur do siebie jest etapem limitującym cały proces. Schematy te dopuszczają wielotorowość procesu zwijania, a ich szczególnym przypadkiem jest schemat sekwencyjny (Ryc. 3).

Jeśli w białku dość licznie reprezentowane są reszty hydrofobowe to możliwy jest schemat hydrofobowej zapaści [68-70]. Przy dużej liczbie reszt hydrofobowych oddziaływania hydrofobowe stają się wiodącą siłą w procesie zwijania łańcucha białkowego. W takim przypadku dochodzi do gwałtownego wypierania cząsteczek wody i polarnych reszt na zewnątrz cząsteczki białkowej — tworzenia jądra hydrofobowego, prawdopodobnie początkowo bez tworzenia elementów struktury drugorzędowej. W następnym etapie powstają elementy struktury drugorzędowej, a w kolejnych, znacznie wolniejszych, etapach, dochodzi do lokalnych przegrupowań i dopasowania struktury przestrzennej globuli (Ryc. 3). Jednym z ostatnich etapów tego procesu może być powstanie struktury zwanej rozluźnioną globulą [32, 33].

W schemacie układanki (ang. *jigsaw puzzle*) nie czynimy żadnych ograniczeń dotyczących fazy początkowej procesu zwijania i dodatkowo uwzględniamy wielotorowość procesu zwijania, czyli czynimy wszystko byleby dojść do jedyne go celu — struktury natywnej [71-73], patrz Ryc. 3. Wiadomo, że proces dopasowywania elementów zachodzi płynnie, kiedy poszczególne elementy układanki mają wyraźną kolorystykę, a wtedy schemat sekwencyjny jest jego szczególnym przypadkiem. Natomiast w przypadku, gdy kolorystyka elementów układanki jest zawiła, to otrzymywane stany pośrednie w kolejnych „próbach” dokładania elementów będą przypo-

minały postępowanie podobne do tych znanych ze schematów szkieletowego lub dyfuzyjno-zderzeniowo-adhezyjnego. Schemat układanki nie pokrywa przypadków opisywanych przez schematy rosnącego zarodka i zapaści hydrofobowej.

Większość z powyższych schematów została opracowana dla opisu zwijania konkretnych białek toteż mają one różny stopień ogólności i stosowności. Ogólnego schematu zwijania białek jeszcze nie opracowano, a z przedstawionych opisów widać jak złożonym jest ten proces i jak trudno będzie taki schemat opracować.

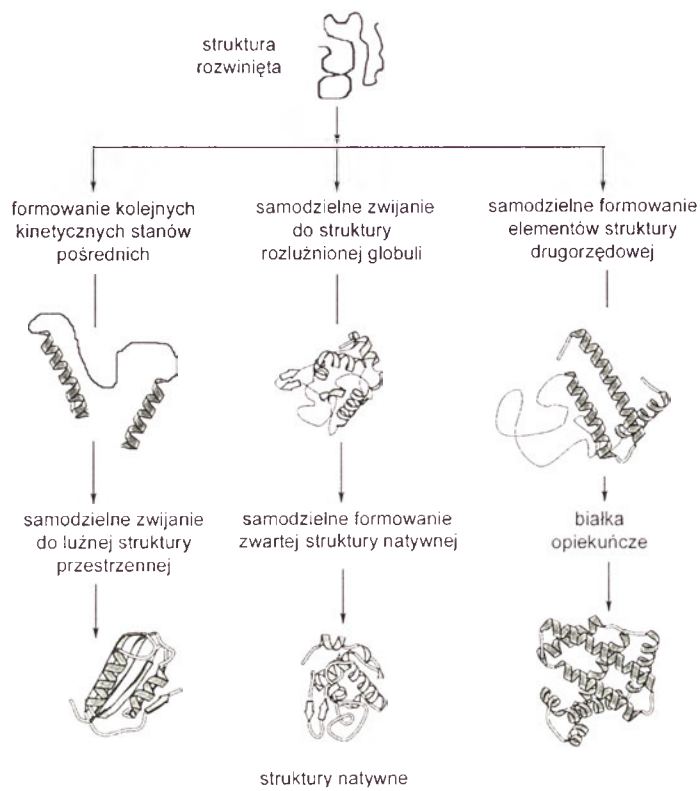
Proces zwijania łańcucha białkowego jest procesem bardzo szybkim, np. łańcuch anhidrazy węglanowej w 23°C całkowicie zwija się w ciągu 0,3 s [29, 74]. Natomiast tworzenie zwartej, ale jeszcze nienatywnej struktury, obserwowane za pomocą zmian amplitudy dichroizmu kołowego w dalekim UV, trwa około stukrotnie krócej.

V. Drogi zwijania białek

Rozwinięty łańcuch polipeptydowy, umieszczony w naturalnych warunkach, zawsze zaczyna się samodzielnie zwijać. Jego celem jest struktura natywna, ale czy cel zostanie osiągnięty samodzielnie zależy od złożoności struktury natywnej. Zwijające się białka mogą wybrać jedną z trzech dróg (Ryc. 4): (i) sekwencyjne zwijanie się do struktury natywnej za pośrednictwem kinetycznych stanów pośrednich; (ii) szybkie zwinięcie się do stanu rozluźnionej globuli, a następnie dopasowywanie łańcuchów bocznych do zwartej, natywnej struktury; (iii) zwijanie za pomocą białek opiekuńczych (chaperonów).

W przypadku zwijania się białka zgodnie z jednym z czterech pierwszych złożonych schematów, przedstawionych na Ryc. 3, otrzymujemy dość luźne struktury, a przejścia strukturalne mają charakter przejść fazowych drugiego rodzaju. Jeśli, natomiast, zwijanie się białka odbywa się za pośrednictwem struktury rozluźnionej globuli to struktura będzie silnie upakowana, zwarta i wysoce stabilna. Zmiany strukturalne prowadzące do struktury rozluźnionej globuli będą miały charakter przejść fazowych drugiego rodzaju, natomiast przejście strukturalne od struktury rozluźnionej globuli do struktury natywnej będzie miało charakter przejścia fazowego pierwszego rodzaju [29, 75].

Jeśli struktura białka jest dostatecznie skomplikowana lub w trakcie zwijania się łańcucha polipeptydowego zdarzyły się jakieś nadzwyczajne procesy, które spowodowały proces nieprawidłowego zwijania, to takie łańcuchy białkowe muszą skorzystać z



Ryc. 4. Schemat opisujący poznane drogi zwijania łańcuchów białkowych. Na schemacie pokazano stany strukturalne cząsteczek w poszczególnych fazach zwijania łańcuchów, a nie zwracano uwagi na ich długość w poszczególnych częściach ryciny.

białek opiekuńczych (chaperonów). W dalszej części białkom tym poświęcimy nieco więcej uwagi.

VI. Rodziny białek opiekuńczych (chaperonów)

Łańcuch białkowy częściowo zwinięty lub niewłaściwie zwinięty, który nie może dalej kontynuować swego zwijania musi skorzystać z pomocy białek opiekuńczych, często, z przyczyn historycznych, zwanych także białkami szoku termicznego — Hsp (ang. *heat shock protein*) [76]. Znanych jest kilka rodzin białek opiekuńczych (Ryc. 5).

Na wstępie należy wspomnieć o tzw. wewnątrzcząsteczkowych chaperonach, czyli o peptydach opiekuńczych. W przypadku pro-białek lub pre-pro-białek często odtrawialna część łańcucha ma decydujące znaczenie dla prawidłowego zwinięcia cząsteczki białka [77]. Np. punktowa mutacja w odtrawialnej części łańcuch pro-subtylizyny prowadzi do niewłaściwego zwijania całej cząsteczki białka i to niewłaściwe ułożenie łańcucha pozostaje nawet po odtrawieniu pro-peptydu [78, 79]. Niektóre pro-peptydy mogą też uczestniczyć w regulacji procesów komórkowych, takich jak: transport i lokalizacja [80], oligomeryzacja [81, 82], a nawet regulacja aktywno-

ści białka [83]. Więcej informacji na ten temat Czytelnik znajdzie w pracach przeglądowych [84-86].

Rodzina najmniejszych białek opiekuńczych często jest nazywana rodziną Hsp25, w której tak naprawdę występują białka o masach od 20 do 30 kDa. Jak się obecnie sądzi, na podstawie wyników badań jednego z najbardziej rozpowszechnionych przedstawicieli tej rodziny — α -kryształiny ($\approx 30\%$ białek oka i $\approx 90\%$ soczewki ocznej) — białka te mają za zadanie wiązanie białek znajdujących się w stanach pośrednich na drodze zwijania, aby nie dopuścić do ich agregacji. Np. α -kryształina odpowiedzialna jest za przezroczystość soczewki i jest jednym z głównych składników tej soczewki [87].

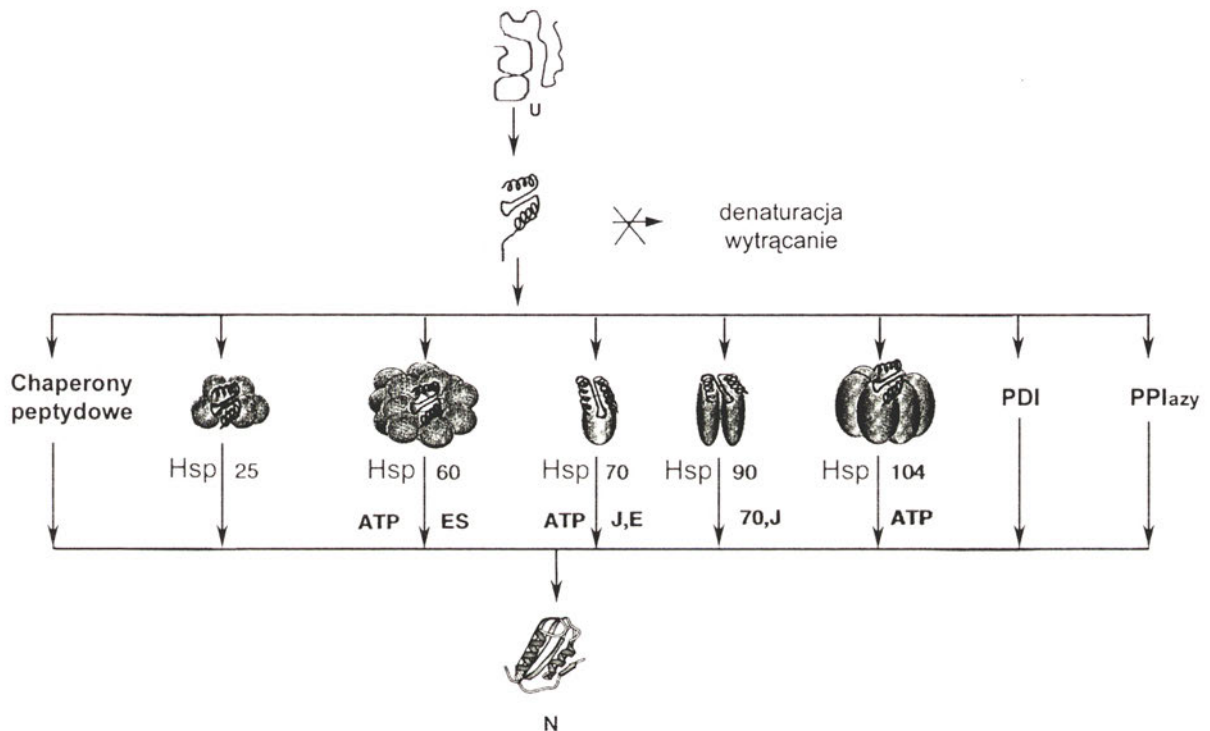
Głównym przedstawicielem rodziny białek opiekuńczych Hsp60 jest białko GroEL bakterii *E. coli* zwane też czaperoniną. Ustalono strukturę jej monomeru [88] i aktywnego kompleksu [89]. Czaperonina bakteryjna [90-94] podobnie jak jej odpowiedniki z komórek eukariotycznych [95-99] są przedmiotem licznych prac przeglądowych (więcej o tych białkach w towarzyszącej pracy [100]).

Kolejną rodzinę białek opiekuńczych są białka rodziny Hsp70, które posiadają właściwości słabych ATPaz i jako nieliczne mogą działać w formie monomerycznej (zwłaszcza w przypadku świeżo syntezo-

wanych białek), choć mogą też wspomagać białka opiekuńcze innych rodzin [101]. Jeśli białka rodziny Hsp70 nie mogą zwinąć łańcucha polipeptydowego samodzielnie to mogą dostarczyć go czaperoninie [102]. Między innymi w reticulum endoplazmatycznym (ER) występuje białko opiekuńcze tej rodziny o nazwie BiP, który nadzoruje łączenie się podjednostek immunoglobulin w ich aktywne oligomery [103]. Białka opiekuńcze tej rodziny biorą udział w regulacji aktywności supresora komórek nowotworowych - białka p53 [104, 105]. Generalnie białka opiekuńcze tej rodziny chronią odcinki nowo synte-

dobnie jak Hsp70, ta rodzina białek (Hsp90) jest w stanie rozpoznawać eksponowane sekwencje w późnym stadium zwijania łańcucha peptydowego [110].

Inną rodziną białek opiekuńczych jest rodzina Hsp104 (wchodzi do niej białko opiekuńcze o masach cząsteczkowych powyżej 100 kDa). Uważa się, że u drożdży białka te są odpowiedzialne za termiczną wrażliwość komórek. Białka rodziny Hsp104 mogą współuczestniczyć w procesie naprawiania struktury białek-substratów z innymi białkami opiekuńczymi [111]. Przypuszcza się, że kompleksy białek Hsp104 mogą wywoływać rozpad agregatów



Ryc. 5. Schemat ilustrujący uczestnictwo głównych rodzin białek opiekuńczych w procesie zwijania łańcucha białkowego. Nazwy rodzin podane pod schematami przedstawiającymi ich budowę, a pod nazwami wymieniono składniki istotne dla funkcjonowania danej rodziny białek opiekuńczych. PDI — (ang. *protein disulphide isomerases*) izomeryzy dwusiarczkowe białek; PPIazy — (ang. *peptidyl prolyl isomerases*) peptydyloprolylowe izomeryzy.

zowanych łańcuchów polipeptydowych bogate w reszty hydrofobowe [106, 107] lub hydrofobowe obszary powierzchni częściowo zwiniętych białek [76, 108, 109].

Następną rodziną białek opiekuńczych są białka Hsp90, które najczęściej występują w towarzystwie innych białek, a zwłaszcza Hsp70 i izomerazy prolylowych (np. Cyp40, FKPB 56 zwane też p56). Kompleksy tych białek często spełniają oprócz funkcji białek opiekuńczych również funkcje transportowe (dostarczają steroidy, kinazy okołobłonowe itp. do błon). W badaniach *in vitro* Hsp90 rozpoznaje i wiąże również białka znajdujące się w stanach nienatywnych, a więc zapobiega ich agregacji. Hsp90 oddziałuje również z peptydami, a to oznacza, że po-

białkowych i w ten sposób umożliwiać działanie innych rodzin białek opiekuńczych [112].

Zazwyczaj spośród białek opiekuńczych wymienia się izomeryzy: peptydyloprolylowe (PPI) i dwusiarczkowe białek (PDI), a więc enzymy bardzo ważne dla procesu zwijania natywnej struktury niektórych białek. Pierwszy z tych enzymów (PPI) katalizuje reakcję *cis/trans* izomeryzacji reszt prolinowych w sytuacji, kiedy proces zwijania łańcucha został zablokowany przez niewłaściwy izomer reszty prolinowej [113, 114]. Izomeraza dwusiarczkowa (PDI) katalizuje reakcje tworzenia mostków dwusiarczkowych lub ich redukcji, jeśli okażą się one niewłaściwe dla natywnej struktury białka [76, 115]. Mostki te są wiązaniami chemicznymi stabilizującymi

zującymi strukturę wielu, a zwłaszcza małych, białek. Poza tym PDI może czasem spełniać typowe funkcje chaperonowe [116, 117].

Wiele białek pełni swą funkcję będąc zanurzone w błonach komórkowych, dla tych białek obecność lipidów często jest niezbędna dla procesu prawidłowego zwijania i osiągnięcia struktury natywnej. Czytelników zainteresowanych tą tematyką odsyłam do pracy przeglądowej [118].

VII. Zakończenie

Niezależnie od tego, że badania nad procesem zwijania łańcuchów polipeptydowych prowadzone są od ponad czterdziestu lat, a w ostatnim okresie pojawia się rocznie około 2500 prac poświęconych temu problemowi [27], ciągle nie znamy do końca, w jakim stopniu poszczególne rodzaje sił decydują o tym procesie oraz w jaki sposób odczytywana jest informacja zawarta w sekwencji białka. Innymi słowy, wychodząc z sekwencji białka nie potrafimy, w sposób wiarygodny, przewidzieć jego struktury. Natomiast zdajemy sobie sprawę jak cenna jest to wiedza, ponieważ wiele groźnych chorób ma swą przyczynę w źle zwiniętych cząsteczkach białkowych [119-124].

Choroba znana pod nazwą syndromu Marfana wywołana jest punktową mutacją (R1137P) w łańcuchu białka zwanego fibryliną [125]. Zastąpienie reszty argininowej resztą prolinową, która charakteryzuje się unikalnymi możliwościami konformacyjnymi, powoduje niewłaściwe zwijanie jednej z domen tego białka (domeny podobnej do domeny epidermalnego czynnika wzrostu, EGF), a w konsekwencji cała cząsteczka nie może przyjąć struktury natywnej białka dzikiego typu.

Groźna choroba — encefalopatia gąbczasta była (BSE), popularnie zwana „chorobą szalonych krów”, która jeszcze niedawno zajmowała pierwsze miejsce w serwisach informacyjnych, prawdopodobnie też ma swą przyczynę w zmianach strukturalnych białka prionowego [126-130]. A jego cząsteczki ze zmienioną strukturą mają tendencję do agregacji i tworzenia złogów białkowych w komórce [131-133]. Sądzi się, że tworzenie amyloidowych płytek przez β -amyloidowy peptyd to przyczyna choroby Alzheimera [134-137]. Do tej samej grupy chorób, których przyczyną jest chorobotwórcza struktura (ang. *toxic folds*), należą choroby Huntingtona i Parkinsona [138-140] oraz kilkanaście innych [119, 124].

Anemia sierpowata przestała być dyżurną chorobą „molekularną”, a za pewnik można przyjąć, że dalszy rozwój nauk biologicznych będzie sprzyjał

kojarzeniu kolejnych chorób z „toksycznymi” strukturami białkowymi.

Artykuł otrzymano 8 listopada 2001

Zaakceptowano do druku 7 stycznia 2002

Piśmiennictwo

1. Anfinsen C B, Haber E, Sela M, White J, F W (1961) *Proc Natl Acad Sci USA* **47**: 1309-1314
2. Danc h i n A (1999) *Curr Opin Struct Biol* **9**: 363-367
3. Anfinsen C B (1972) *Biochem J* **128**: 737-749
4. Anfinsen C B (1973) *Science* **181**: 223-230
5. Brandts J F (1964) *J Am Chem Soc* **86**: 4291-4301
6. Ginsburg A, Carroll W R (1965) *Biochemistry* **4**: 2159-2174
7. Lumry R, Biltonen R, Brandts J F (1966) *Biopolymers* **4**: 917-944
8. Tanford C (1968) *Adv Protein Chem* **23**: 121-282
9. Tanford C (1970) *Adv Protein Chem* **24**: 1-95
10. Anfinsen C B, Scheraga H A (1975) *Adv Protein Chem* **29**: 205-300
11. Scheraga H A, Konishi Y, Ooi T (1984) *Adv Biophys* **18**: 21-41
12. Creighton T E (1975) *J Mol Biol* **95**: 167-199
13. Creighton T E (1977) *J Mol Biol* **113**: 275-293
14. Creighton T E, Goldenberg D P (1984) *J Mol Biol* **179**: 497-526
15. Oas T G, Kim P S (1988) *Nature* **336**: 42-48
16. Weissman J S, Kim P S (1991) *Science* **253**: 1386-1393
17. Dadlez M (1997) *Acta Biochim Polon* **44**: 433-452
18. Creighton T E (1997) *Biol Chem* **378**: 731-744
19. Scheraga H A, Paine G H (1986) *Ann N Y Acad Sci* **482**: 60-68
20. Karplus M, Sali A (1995) *Curr Opin Struct Biol* **5**: 58-73
21. Mirny L A, Abkevich V, Shakhnovich E I (1996) *Fold Des* **1**: 103-116
22. Dobson C M, Karplus M (1999) *Curr Opin Struct Biol* **9**: 92-101
23. Scheraga H A (1996) *Biophys Chem* **59**: 329-339
24. Dinner A R, Sali A, Smith L J, Dobson C M, Karplus M (2000) *Trends Biochem Sci* **25**: 331-339
25. Levinthal C (1968) *J Chim Phys* **65**: 44-45
26. Jaenicke R (1999) *Prog Biophys Mol Biol* **71**: 155-241
27. Radford S E (2000) *Trends Biochem Sci* **25**: 611-618
28. Ptitsyn O B (1986) *J Prot Chem* **6**: 273-293
29. Ptitsyn O B (1992) *The molten globule state s. 243-300 w: Protein folding* T E Creighton (red.) W H Freeman and Company, New York
30. Ptitsyn O B (1995) *Trends Biochem Sci* **20**: 376-379
31. Ptitsyn O B (1995) *Adv Protein Chem* **47**: 83-229
32. Ptitsyn O B (1996) *Nat Struct Biol* **3**: 488-490
33. Kuwajima K (1996) *FASEB J* **10**: 102-109
34. Taniuchi H (1970) *J Biol Chem* **245**: 5459-5468
35. Peng Z Y, Kim P S (1994) *Biochemistry* **33**: 2136-2141
36. Goldberg M E (1969) *J Mol Biol* **46**: 441-446
37. Wetlaufer D B (1973) *Proc Natl Acad Sci USA* **70**: 697-701
38. Kim P S, Baldwin R L (1982) *Annu Rev Biochem* **51**: 459-489
39. Scheraga H A (1983) *Biopolymers* **22**: 1-14
40. Richardson J S, Richardson D C, Tweedy N B, Gernert K M, Quinn T P, Hecht M H, Erickson B W, Yan Y, McClain R D, Donlan M E, et al. (1992) *Biophys J* **63**: 1185-1209
41. Scheraga H A (1992) *Protein Sci* **1**: 691-693
42. Richards F M, Lim W A (1993) *Q Rev Biophys* **26**: 423-498
43. Baldwin R L (1999) *Nat Struct Biol* **6**: 814-817
44. Scheraga H A, Wedemeyer W J, Welker E (2001) *Methods Enzymol* **341**: 189-221
45. Tsong T Y, Baldwin R L (1972) *J Mol Biol* **63**: 453-469

46. Elson E L (1972) *J Mol Biol* **63**: 469-475
47. Clarke A R, Walther J P (1997) *Curr Opin Biotechnol* **8**: 400-410
48. Kuwajima K, Semisotnov G V, Finkelstein A V, Sugai S, Plitsyn O B (1993) *FEBS Lett* **334**: 265-268
49. Wolynes P (1998) *Fold Des* **3**: R107
50. Shakhnovich E I (1998) *Fold Des* **3**: R108-R111
51. Lin L N, Brandts J F (1983) *Biochemistry* **22**: 559-563
52. Brandts J F, Lin L N (1986) *Methods Enzymol* **131**: 107-126
53. Piela L, Nemethy G, Scheraga H A (1987) *Biopolymers* **26**: 1587-1600
54. Baldwin R L (1989) *Trends Biochem Sci* **14**: 291-294
55. Wetlaufer D B (1990) *Trends Biochem Sci* **15**: 414-415
56. Wetlaufer D B (1990) *Biotechnology* **14**: 21-35
57. Brandts J F, Halvorson H R, Brennan M (1975) *Biochemistry* **14**: 4953-4963
58. Wlodawer A, Bott R, Sjolín L (1982) *J Biol Chem* **257**: 1325-1332
59. Wlodawer A, Sjolín L (1983) *Biochemistry* **22**: 2720-2728
60. Dodge R W, Scheraga H A (1996) *Biochemistry* **35**: 1548-1559
61. Chakrabarti P, Pal D (2001) *Prog Biophys Mol Biol* **76**: 1-102
62. Pal D, Chakrabarti P (1999) *J Mol Biol* **294**: 271-288
63. Cohen F E, Sternberg M J, Phillips D C, Kuntz I D, Kollman P A (1980) *Nature* **286**: 632-634
64. Lee S Y, Karplus M, Bashford D, Weaver D (1987) *Biopolymers* **26**: 481-506
65. Brems D N, Plaisted S M, Havel H A, Kauffman E W, Stodola J D, Eaton L C, White R D (1985) *Biochemistry* **24**: 7662-7668
66. Brems D N, Plaisted S M, Dougherty J J, Jr., Holzman T F (1987) *J Biol Chem* **262**: 2590-2596
67. Udgaonkar J B, Baldwin R L (1988) *Nature* **335**: 694-699
68. Agashe V R, Shastry M C, Udgaonkar J B (1995) *Nature* **377**: 754-757
69. Arai M, Kuwajima K (1996) *Fold Des* **1**: 275-287
70. Yao J, Chung J, Eliezer D, Wright P E, Dyson H J (2001) *Biochemistry* **40**: 3561-3571
71. Harrison S C, Durbin R (1985) *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**: 4028-4030
72. Bromberg S, Dill K A (1994) *Protein Sci* **3**: 997-1009
73. Gassner N C, Baase W A, Matthews B W (1996) *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 12155-12158
74. Semisotnov G V, Rodionova N A, Razgulyaev O I, Uversky V N, Gripas A F, Gilmanshin R I (1991) *Biopolymers* **31**: 119-128
75. Lifshitz I M, Grosberg A Y, Khokholov A R (1978) *Rev Modern Phys* **50**: 683-713
76. Gething M J, Sambrook J (1992) *Nature* **355**: 33-45
77. Winther J R, Sorensen P, Kielland-Brandt M C (1994) *J Biol Chem* **269**: 22007-22013
78. Ikemura H, Takagi H, Inouye M (1987) *J Biol Chem* **262**: 7859-7864
79. Buevich A V, Shinde U P, Inouye M, Baum J (2001) *J Biomol NMR* **20**: 233-249
80. Kervinen J, Tobin G J, Costa J, Waugh D S, Wlodawer A, Zdanov A (1999) *EMBO J* **18**: 3947-3955
81. Zuhl F, Seemuiler E, Golbik R, Baumeister W (1997) *FEBS Lett* **418**: 189-194
82. Cigic B, Krizaj I, Kralj B, Turk V, Pain R H (1998) *Biochim Biophys Acta* **1382**: 143-150
83. Shinde U P, Liu J J, Inouye M (1997) *Nature* **389**: 520-522
84. Shinde U, Inouye M (1993) *Trends Biochem Sci* **18**: 442-446
85. Shinde U, Inouye M (1996) *Adv Exp Med Biol* **379**: 147-154
86. Shinde U, Inouye M (2000) *Semin Cell Dev Biol* **11**: 35-44
87. Horwitz J (1992) *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**: 10449-10453
88. Braig K, Otwinowski Z, Hegde R, Boisvert D C, Joachimiak A, Horwich A L, Sigler P B (1994) *Nature* **371**: 578-586
89. Xu Z, Horwich A L, Sigler P B (1997) *Nature* **388**: 741-750
90. Harrison C J (1997) *Structure* **5**: 1261-1264
91. Ellis R J, Hartl F U (1999) *Curr Opin Struct Biol* **9**: 102-110
92. Saibil H (2000) *Curr Opin Struct Biol* **10**: 251-258
93. Grallert H, Buchner J (2001) *J Struct Biol* **135**: 95-103
94. Brinker A, Pfeifer G, Kerner M J, Naylor D J, Hartl F U, Hayer-Hartl M (2001) *Cell* **107**: 223-233
95. Feldman D E, Frydman J (2000) *Curr Opin Struct Biol* **10**: 26-33
96. Archibaid J M, Blouin C, Doolittle W F (2001) *J Struct Biol* **135**: 157-169
97. Dunn A Y, Melville M W, Frydman J (2001) *J Struct Biol* **135**: 176-184
98. Melki R (2001) *J Struct Biol* **135**: 170-175
99. Steinbacher S, Ditzel L (2001) *J Struct Biol* **135**: 147-156
100. Osipiuk J (2002) *Post Biochem* **48**: 94-100
101. Bukau B, Horwich A L (1998) *Cell* **92**: 351-366
102. Palleros D R, Reid K L, Shi L, Welch W J, Fink A L (1993) *Nature* **365**: 664-666
103. Knarr G, Gething M J, Modrow S, Buchner J (1995) *J Biol Chem* **270**: 27589-27594
104. King F W, Wawrzynow A, Hohfeld J, Zylicz M (2001) *EMBO J* **20**: 6297-6305
105. Zylicz M, King F W, Wawrzynow A (2001) *EMBO J* **20**: 4634-4638
106. Flynn G C, Pohl J, Flocco M T, Rothman J E (1991) *Nature* **353**: 726-730
107. Landry S J, Jordan R, McMacken R, Gierasch L M (1992) *Nature* **355**: 455-457
108. Hartl F U, Martin J, Neupert W (1992) *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **21**: 293-322
109. Hartl F U (1996) *Nature* **381**: 571-579
110. Buchner J (1999) *Trends Biochem Sci* **24**: 136-141
111. Glover J R, Lindquist S (1998) *Cell* **94**: 73-82
112. Ben-Zvi A P, Goloubinoff P (2001) *J Struct Biol* **135**: 84-93
113. Schonbrunner E R, Mayer S, Tropschug M, Fischer G, Takahashi N, Schmid F X (1991) *J Biol Chem* **266**: 3630-3635
114. Schmid F X (1995) *Curr Biol* **5**: 993-994
115. Hillson D A, Lambert N, Freedman R B (1984) *Methods Enzymol* **107**: 281-294
116. Puig A, Gilbert H F (1994) *J Biol Chem* **269**: 7764-7771
117. Puig A, Primm T P, Surendran R, Lee J C, Ballard K D, Orkiszewski R S, Makarov V, Gilbert H F (1997) *J Biol Chem* **272**: 32988-32994
118. Bogdanov M, Dowhan W (1999) *J Biol Chem* **274**: 36827-36830
119. Thomas P J, Qu B H, Pedersen P L (1995) *Trends Biochem Sci* **20**: 456-459
120. Qu B H, Strickland E, Thomas P J (1997) *J Bioenerg Biomembr* **29**: 483-490
121. Dobson C M (1999) *Trends Biochem Sci* **24**: 329-332
122. Soto C (1999) *J Mol Med* **77**: 412-418
123. Ferreira S T, De Felice F G (2001) *FEBS Lett* **498**: 129-134
124. Soto C (2001) *FEBS Lett* **498**: 204-207
125. Wu Y S, Bevilacqua V L, Berg J M (1995) *Chem Biol* **2**: 91-97
126. Gasset M, Baldwin M A, Fletterick R J, Prusiner S B (1993) *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**: 1-5
127. Horwich A L, Weissman J S (1997) *Cell* **89**: 499-510
128. Heppner F L, Arrighi I, Kalinke U, Aguzzi A (2001) *Trends Mol Med* **7**: 477-479
129. Aguzzi A, Glatzel M, Montrasio F, Prinz M, Heppner F L (2001) *Nat Rev Neurosci* **2**: 745-749
130. Heppner F L, Musahl C, Arrighi I, Klein M A, Rulicke T, Oesch B, Zinkernagel R M, Kalinke U, Aguzzi A (2001) *Science* **294**: 178-182
131. Reiss C, Lesnik T, Parvez H, Parvez S, Ehrlich R (2000) *Toxicology* **153**: 115-121
132. Borg J, Jensen M H, Snekken K, Tiana G (2001) *Phys Rev Lett* **86**: 1031-1033

133. Viles J H, Donne D, Kroon G, Prusiner S B, Cohen F E, Dyson H J, Wright P E (2001) *Biochemistry* **40**: 2743-2753
134. Sisodia S S, Price D L (1995) *FASEB J* **9**: 366-370
135. Selkoe D J (1998) *Trends Cell Biol* **8**: 447-453
136. Hooper N M, Turner A J (2000) *Biochem Soc Trans* **28**: 441-446
137. Imaizumi K, Miyoshi K, Katayama T, Yoneda T, Taniguchi M, Kudo T, Tohyama M (2001) *Biochim Biophys Acta* **1536**: 85-96
138. Wanker E E (2000) *Mol Med Today* **6**: 387-391
139. Muchowski P J, Schaffar G, Sittler A, Wanker E E, Hayer-Hartl M K, Hartl F U (2000) *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 7841-7846
140. Heiser V, Scherzinger E, Boeddrich A, Nordhoff E, Lurz R, Schugardt N, Lehraich H, Wanker E E (2000) *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 6739-6744

Katepsyna B a proces inwazji nowotworowej

Cathepsin B and cancer invasion

WOJCIECH PORĘBA¹, KATARZYNA GAWLIK², JAN GUTOWICZ³

Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Charakterystyka cysteinowych katepsyn lizosomalnych
- III. Synteza, aktywacja i kierowanie katepsyny B do lizosomów
- IV. Strukturalne podstawy aktywności enzymatycznej katepsyny B
- V. Rola katepsyny B w procesie przerzutowania nowotworów
- VI. Wewnątrzkomórkowa i pozakomórkowa aktywność katepsyny B w nowotworach
- VII. Podsumowanie

Wykaz stosowanych skrótów: Cat — katepsyna; CP — proteazy cysteinowe; MHC — główny układ zgodności tkankowej; uPA — aktywator plazminogenu typu urokinazowego; EGF — naskórkowy czynnik wzrostu; TNF- α — czynnik- α martwicy nowotworu; RA — kwas retinoidowy; ECM — macierz pozakomórkowa; pI — punkt izoelektryczny; UTR — region nie podlegający translacji; ER — retikulum endoplazmatyczne

I. Wstęp

Nazwa katepsyna pochodzi od greckiego wyrazu oznaczającego „trawić” i została wprowadzona w 1929 roku dla określenia enzymu proteolitycznego [1]. Dziś terminem tym określa się enzymy proteolityczne występujące głównie w lizosomach i wykazujące optimum aktywności katalitycznej przy pH 5.0-6.5 [2, 3]. Katepsyna B (EC 3.4.22.1) jest lizosomalną proteazą cysteinową, której podwyższoną aktywność i zmienioną lokalizację obserwuje się w wielu stanach chorobowych, w tym także w procesie inwazji nowotworowej [4-13]. Cecha inwazyjności nowotworu związana jest z aktywnością proteaz, zlokalizowanych na powierzchni komórek nowotworowych, co umożliwia tym komórkom pokonanie kolejnych barier w procesie przerzutowania do od-

Contents:

- I. Introduction
- II. Lysosomal cysteine cathepsins
- III. Synthesis, activation and lysosomal targeting of cathepsin B
- IV. Structural basis for enzymatic activity of cathepsin B
- V. Cathepsin B involvement in cancer metastasis
- VI. Intracellular and extracellular cathepsin B activity in cancer
- VII. Conclusions

ległych miejsc od guza pierwotnego. Rola proteaz w rozwoju nowotworu jest intensywnie badana i dyskusyjowana, ponieważ terapia i diagnostyka chorób nowotworowych wciąż są jednymi z największych wyzwań medycyny. Natomiast podstawą współczesnej walki z nowotworami są badania nad wyjaśnieniem szczegółowych mechanizmów powstawania i rozwoju komórek nowotworowych na poziomie molekularnym, z zastosowaniem metodologii biologii molekularnej i biochemii.

Spośród cysteinowych proteaz (CP), katepsyna B (CatB) jest enzymem, którego rola w procesie przerzutowania należy do najlepiej udokumentowanych [patrz art. przegl. 4, 6, 9, 14, 15].

W niniejszym artykule przedstawiono aktualny stan wiedzy dotyczącej zarówno roli zmian ekspresji katepsyny B w komórkach rozwijających się nowotworów, jak i podstaw analizy aktywności tej katepsyny w diagnozowaniu typu i stadium choroby nowotworowej. Dokładne poznanie mechanizmu aktywności katalitycznej i jej regulacji w stanach fizjologicznych i patologicznych nie jest jednak możliwe bez znajomości wyników badań dotyczących struktury cząsteczki tego enzymu. Dlatego omówienie roli katepsyny B w procesie nowotworzenia poprzedziliśmy zagadnieniami związanymi z biosyntezą, strukturą cząsteczkową oraz regulacją aktywności enzymatycznej tej proteazy w tkankach prawidłowych i nowotworowych.

¹Mgr, ²mgr, ³dr hab.; Uniwersytet Wrocławski, Instytut Mikrobiologii, Zakład Fizykochemii Drobnoustrojów, ul. Przybyszewskiego 63/77, 52-148 Wrocław

Dla poznania relacji pomiędzy strukturą cząsteczkową i funkcją katepsyny B wykorzystuje się badania oddziaływań tego enzymu ze znanymi, a także wciąż odkrywanymi naturalnymi i syntetycznymi inhibitorami [16-18]. Badania te, oprócz bardzo ważnego znaczenia *stricte* poznawczego, mają ogromne perspektywy w rozwoju medycyny [2, 14, 19, 20]. Pomiar aktywności proteolitycznej katepsyny B znalazł zastosowanie w diagnostyce nowotworów, pozwalając na identyfikację stadium choroby nowotworowej oraz na określenie inwazyjności guza pierwotnego [14, 21, 22]. Podejmuje się próby stosowania inhibitorów cysteinowych proteaz do ingerowania regulacji aktywności CP w walce z przerzutami komórek nowotworowych [19].

II. Charakterystyka cysteinowych katepsyn lizosomalnych

W bazie danych MEROPS (dostępnej pod adresem www.merops.co.uk) cysteinowe proteazy sklasyfikowane są w siedmiu klanach o nazwach: CA, CD, CE, CF, CH, PA i PB. W poszczególnych klanach wyróżnia się rodziny proteaz, przy czym około połowę wszystkich rodzin proteaz cysteinowych zaklasyfikowano do klanu CA [23]. Katepsyny B, C, F, H, K, L, S, O, V, X, W należą do rodziny papainy (C1) w klanie CA [23]. Większość cysteinowych proteaz funkcjonuje jako endopeptydazy, przy czym CatC jest dipeptydylo-aminopeptydazą, a CatH endo- i aminopeptydazą. Katepsyna B oprócz aktywności endopeptydazowej wykazuje również aktywność dipeptydylo karboksypeptydazy, czyli ma zdolność odcinania dipeptydów z karboksylowego końca łańcucha polipeptydowego [24]. Większość katepsyn to stosunkowo małe białka o masie M_r 20-35 kDa, za wyjątkiem katepsyny C, która jest oligomerym o M_r ok. 200 kDa [6].

Dość dobrze poznany jest udział katepsyn w wielu procesach metabolicznych komórek prawidłowych, jakkolwiek nadal identyfikuje się nowe fizjologiczne substraty tych enzymów [15]. Katepsyny uczestniczą w lizosomalnej degradacji białek, której produkty (aminokwasy i dipeptydy) dyfundują przez błonę lizosomalną i zużywane są wtórnie do syntezy białek. Wysoki poziom katepsyn obserwuje się w tkankach, w których zachodzą intensywne przemiany białek, np. w wątrobie i śledzionie [7, 25]. Katepsyny uczestniczą także w pozalizosomalnej degradacji białek [1]. Cysteinowe proteazy lizosomalne zaangażowane są w proteolityczną obróbkę prohormonów białkowych i proenzymów. Na przykład, aktywacja prohormonów tarczycy odbywa się dzięki po-

zakomórkowej aktywności cysteinowych proteaz [26]. Katepsyna B aktywuje m.in. prekursor β -galaktozydazy i zymogen reniny [6, 27] a wraz z katepsyną L i katepsyną S degradowuje inhibitor leukoproteazy, ochraniający komórki płuc przed proteolityczną aktywnością elastazy uwalnianej przez neutrofile [12]. Wyniki najnowszych badań nad myszami, u których inaktywowano geny kodujące katepsyny B i D wykazały, że (wbrew wcześniejszym przypuszczeniom [28]) aktywność tych proteaz nie jest niezbędna w procesie prezentacji antygeny przez białka układu MHC klasy II [29]. Katepsyna B może aktywować uPA (aktywator plazminogenu typu urokinazowego) [30], bierze udział w degradacji EGF (naskórkowy czynnik wzrostu) [31] oraz w stymulacji angiogenezy przez degradację inhibitorów metaloproteinaz [32]. Stwierdzono, że aktywność CatB jest główną przyczyną patologicznej, przedwczesnej aktywacji trypsynogenu w trzustce, na skutek czego dochodzi do ostrego zapalenia trzustki [33]. Wiadomo również, że katepsyna B bierze udział w kaskadzie przekazywania sygnału do apoptozy w hepatocytach myszy indukowanej przez TNF- α (czynnik- α martwicy nowotworu) [34]. Rola katepsyny B w apoptozie nie jest całkowicie wyjaśniona. Wydaje się jednak, że indukuje ona uwalnianie cytochromu *c* z mitochondriów, a to z kolei aktywuje kaspazy 9 i 3 [34, 35]. Pozakomórkową lokalizację i podwyższoną aktywność proteolityczną katepsyn zaobserwowano w wielu stanach chorobowych, np. katepsyn B i L w zapaleniu stawów, katepsyn B, D i S w chorobie Alzheimera, katepsyny B w dystrofii mięśniowej oraz katepsyn B, D i L w przerzutowaniu komórek nowotworowych [1, 2, 14, 36, 37]. Katepsyna B jest enzymem najintensywniej badanym spośród wymienionych katepsyn, głównie ze względu na rolę, jaką odgrywa w procesie przerzutowania komórek nowotworowych [1, 7, 19].

III. Synteza, aktywacja i kierowanie katepsyny B do lizosomów

Katepsyna B w komórkach wołu kodowana jest przez gen o długości 7.3 kbp, złożony z dziewięciu eksonów. Analiza sekwencji tego genu wykazała istnienie trzech potencjalnych miejsc poliadenylacji, co wskazuje na istnienie trzech różnych typów transkryptów mRNA dla katepsyny B [38]. W komórkach ludzkich gen kodujący CatB zlokalizowany jest na chromosomie 8p22, ma długość 27 kbp i zbudowany jest z 13 eksonów [39, 40]. Miejsce *start* translacji znajduje się w eksonie 3, eksony 1, 2, 2a/2b i część eksonu 3 tworzą 5'-UTR (ang. *untranslated re-*

gion), niekodujący ekson 12 i większa część eksonu 11 tworzy 3'-UTR [41,42]. Główny promotor nie posiada kasety TATA ani CAAT, jest bogaty w GC, co jest charakterystyczne dla genów *housekeeping* [41]. Pomimo takiej budowy sekwencji promotornej ekspresja genu kodującego katepsynę B nie jest konstytutywna [36]. Dokładne mechanizmy regulacji ekspresji nie zostały jednak jeszcze opisane. Prawdopodobnie ekspresja genu katepsyny B zależy od typu i stadium zróżnicowania komórek [43]. Dla genu kodującego katepsynę B w komórkach ludzkich także wykazano istnienie kilku różnych rodzajów transkryptów, powstających na skutek alternatywnego splicingu pre-mRNA [41]. Różne typy transkryptu dla katepsyny B mogą być spowodowane także dużą zmiennością występującą w regionach 5'-UTR i 3'-UTR, która może prowadzić do różnic na poziomie ilości mRNA, czy szybkości translacji [36].

Na skutek translacji transkryptu powstaje pre-prokatepsyna B w postaci polipeptydu o długości 339 aminokwasów, w którym wyróżnia się: sekwencję sygnałową (17 aa), propeptyd (62 aa), sekwencję dojrzałej katepsyny B (254 aa) oraz C-końcową sekwencję (6 aa) [44]. Dzięki sekwencji sygnałowej pre-prokatepsyna B kierowana jest do ER, następnie do przedziałów *cis* i *trans* aparatu Golgiego, gdzie ulega glikozylacji. W aparacie Golgiego mają miejsce modyfikacje reszt cukrowych i fosforylacja reszty mannozowej, na skutek czego powstaje reszta mannozo-6-fosforanu [14]. Tak zmodyfikowany proenzym rozpoznawany i wiązany jest przez znajdujący się w błonie aparatu Golgiego receptor mannozo-6-fosforanu, następnie kompleks proenzym/receptor (związany z błoną) kierowany jest do wstępnych pęcherzyków lizosomalnych. Kwaśne pH powoduje oddysocjowanie receptora mannozo-6-fosforanu, który powraca do aparatu Golgiego, natomiast wstępne pęcherzyki lizosomalne dojrzewają do lizosomów [2, 14, 45]. Zaburzenia kierowania katepsyny B do lizosomów są prawdopodobnie główną przyczyną zmienionej lokalizacji białka w komórkach nowotworowych. Nie wiadomo dokładnie, jakie zmiany w wewnątrzkomórkowym transporcie enzymów lizosomalnych prowadzą do niefizjologicznej lokalizacji CatB, powodującej wystąpienie inwazyjnego fenotypu komórek nowotworowych. Wykazano, że kwas retinojowy (RA) łącząc się z receptorem mannozo-6-fosforanu powoduje zmianę w wewnątrzkomórkowej lokalizacji katepsyny B w fibroblastach szczura [46]. W komórkach poddanych działaniu RA obserwowano równomierne rozmieszczenie CatB w cytoplazmie, podczas gdy w komórkach hodowanych

bez RA obserwowano jej obecność wyłącznie w przestrzeni okołojądrowej [46].

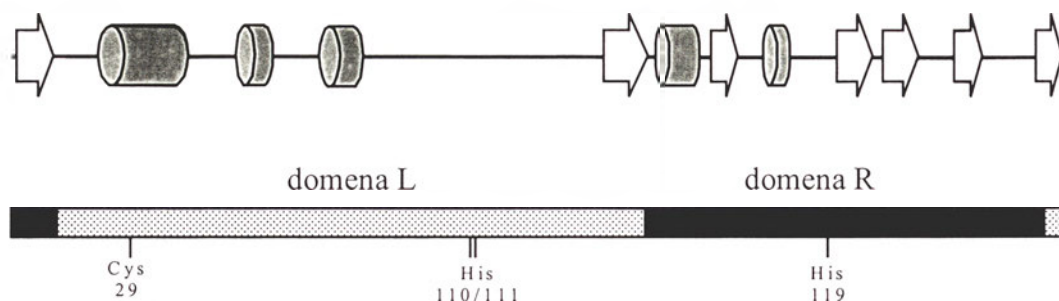
Najważniejszym etapem potranslacyjnej modyfikacji prokatepsyny B jest odcięcie propeptydu, które rozpoczyna się w kwaśnym środowisku przedziału *trans* aparatu Golgiego i trwa ok. 24-48 godzin [47]. Enzymami dokonującymi proteolitycznej aktywacji katepsyny B *in vivo* są najprawdopodobniej katepsyna D [48], metaloproteinaza [49] lub sama CatB [50]. *In vitro* sekwencja propeptydu CatB może być również odcinana dzięki aktywności elastazy, papainy, pepsyny i katepsyny L [51]. Odcięcie propeptydu powoduje powstanie katalitycznie czynnej, jednołańcuchowej cząsteczki enzymu o długości 254 aa, masie 30 kDa i punkcie izoelektrycznym (pI) równym 5.2-5.8 [52]. Kolejnym etapem proteolitycznej obróbki enzymu jest autokatalityczne odcięcie sekwencji C-końcowej [47]. W komórkach ssaków katepsyna B występuje przeważnie w postaci dwułańcuchowej, złożonej z łańcucha lekkiego o masie 5 kDa i łańcucha ciężkiego o masie 25 kDa [38, 53]. Ta dwułańcuchowa postać powstaje przez wycięcie z jednołańcuchowej cząsteczki katepsyny B dipeptydu złożonego z reszt 48 i 49, co odbywa się autokatalitycznie lub przy udziale innej lizosomalnej proteazy, legumainy [44, 54]. Nie opisano dotychczas różnic w aktywności pomiędzy jedno- a dwułańcuchową formą katepsyny B. L i n e b a u g h i wsp. wykazali, że ludzkie komórki raka piersi wydzielają głównie jednołańcuchową postać CatB, podczas gdy w lizosomach tych samych komórek przeważa jej dwułańcuchowa forma [55].

Stwierdzono także translację transkryptów krótszych w porównaniu z transkryptem opisanym wyżej, co powoduje powstanie cząsteczek proenzymu, które pozbawione są sekwencji sygnałowej i części propeptydu, w związku z czym nie następuje kierowanie proenzymu do ER i do lizosomów. Nie wykryto dotychczas hipotetycznej cytoplazmatycznej formy katepsyny B. Nie wiadomo również, czy poza środowiskiem lizosomu może dochodzić do prawidłowej aktywacji proenzymu [56].

IV. Strukturalne podstawy aktywności enzymatycznej katepsyny B

Strukturę ludzkiej katepsyny B poznano dzięki badaniom krystalograficznym enzymu z komórek wątroby ludzkiej [53]. Badania CatB w kompleksie z inhibitorem wykazały podobną budowę katepsyny B z komórek szczura [57]. Dwułańcuchowa cząsteczka ludzkiej CatB ma w przybliżeniu kształt dysku o średnicy 50 Å i grubości 30 Å z wyraźnym zagłębie-

niem, mieszczącym centrum aktywne enzymu. Łańcuch peptydowy zorganizowany jest w dwie domeny nazwane, podobnie jak w cząsteczce papainy, domeną L (*left*) i R (*right*) [53]. Domena L utworzona jest z fragmentów łańcucha polipeptydowego: Gln13-Gly147 i Pro251-Asp254, a domena R z fragmentów Leu1-Pro12 i Tyr148-Ile250 (Rys. 1). Po-



Rys. 1. Schemat drugo- i trzeciorzędowej struktury katepsyny B. (A) — drugorzędowa struktura katepsyny B. Nici β przedstawiono jako białe strzałki, fragmenty o budowie helisy α jako szare walce; (B) — schemat trzeciorzędowej budowy cząsteczki katepsyny B. Domenę R zaczerwniono, domenę L zakropkowano. Zaznaczono także reszty aminokwasowe ważne dla aktywności enzymatycznej [38].

między domenami obserwuje się V-kształtną szczylinę, na dnie której znajduje się centrum aktywne enzymu [53]. Położenie domen stabilizowane jest dipolowymi i jonowymi oddziaływaniami reszt aminokwasowych.

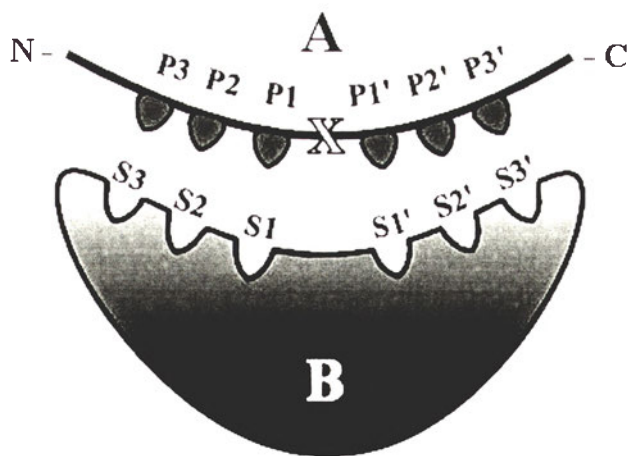
W dwułańcuchowej formie katepsyny B w skład łańcucha lekkiego, o masie 5 kDa wchodzi fragment Leu1-Asn47, zaś fragment Val50-Asp254 tworzy łańcuch ciężki o masie 25 kDa [38]. Cząsteczka enzymu stabilizowana jest sześcioma mostkami dwusiarczkowymi, tworzonymi przez reszty cysteiny, znajdujące się w N-końcowej połowie łańcucha peptydowego [53]. Porównanie sekwencji aminokwasowych CatB i papainy wykazało, że 59 reszt w obu cząsteczkach jest identycznych (stopień homologii 24%). Strukturalnie cząsteczka CatB jest podobna do cząsteczki papainy (166 reszt aminokwasowych w obu cząsteczkach jest topologicznie równoważnych), jednak istnieją różnice wpływające na odmienne właściwości katalityczne tych dwóch enzymów. Reszty Ser104-Pro126 tworzą unikalną dla katepsyny B strukturę, tzw. zamykającą pętlę, (*ang. occluding loop*), kowalencyjnie zamkniętą za pomocą wiązania dwusiarczkowego pomiędzy Cys108 a Cys119 [53].

Katalityczna funkcja katepsyny B, podobnie jak w przypadku pozostałych proteaz papainowych, determinowana jest obecnością tzw. triady katalitycznej, zlokalizowanej w obrębie szczeliny centrum aktywnego i tworzonej przez Cys29, His199 i Asn219. Pierścień imidazolowy His199 zwiększa nukleofilowość reaktywnej grupy tiolowej Cys29, a karboksy-

lowa grupa Asn219 stabilizuje uprotonowaną formę His199, powstającą w stanie przejściowym reakcji. Białkowy substrat przyłącza się wzdłuż szczeliny centrum aktywnego, tworząc wiązania wodorowe z określonymi łańcuchami bocznymi aminokwasów tworzących cząsteczkę enzymu [37]. Do opisu specyficzności oddziaływań substratu z proteazą uży-

wane jest nazewnictwo wprowadzone w 1967 roku, według którego centrum aktywne proteazy składa się z miejsc przyjmujących określone reszty aminokwasowe substratu [58]. Reszty substratu C-końcowe w stosunku do hydrolizowanego wiązania peptydowego nazwane są resztami P1' do P3' i wiązane są przez miejsca S1' do S3' w centrum aktywnym enzymu. Reszty N-końcowe substratu (P1 do P3) wiązane są przez miejsca S1 do S3. Numerację miejsc S i P rozpoczyna się od tych sąsiadujących z hydrolizowanym wiązaniem peptydowym (Rys. 2) [58].

W przypadku papainowych proteaz cysteinowych specyficzność w stosunku do substratu określana jest, przede wszystkim, przez resztę znajdującą się w pozycji P2 [59, 60]. Istnieją preferencje w stosunku do określonych aminokwasów w pozostałych miejscach S i S', lecz reszty P1, P3, P1', P2' i P3' mają mniejszy wpływ na specyficzność substratową [37]. Hydrofobowy charakter miejsca S2 powoduje preferencje dla substratów zawierających reszty fenyloalaniny w pozycji P2. Katepsyna B jako jedyna spośród proteaz papainowych akceptuje także resztę argininy w pozycji P2. Jest to spowodowane obecnością Gln245, która umożliwia oddziaływanie z dodatnio naładowaną grupą guanidylową argininy, przy czym wartość k_{cat}/K_m jest siedmiokrotnie wyższa dla substratów zawierających Phe w P2 [60, 61]. Miejsce S1 w cząsteczce CatB wykazuje preferencję dla dodatnio naładowanych, alifatycznych reszt argininy. Łańcuch boczny Arg w P1 skierowany jest na zewnątrz szczeliny centrum aktywnego i oddziałuje z Glu122, poprawiając dopasowanie substratu [53].



Rys. 2. Schemat ilustrujący nazewnictwo miejsc S i reszt P. A — substrat; B — centrum aktywne proteazy; N — koniec aminowy substratu; C — koniec karboksylowy substratu. Litera X oznaczono hydrolizowane wiązanie peptydowe [58]. Szczegóły w tekście.

Jako P3 preferowane są reszty aromatyczne, hydrofobowe, tworzące wiązanie wodorowe z Asp69 i oddziałujące z Tyr75 [62]. Miejsce S1' katepsyny B tworzy dużą, nie eksponowaną na zewnątrz hydrofobową kieszeń, mogącą przyjmować aromatyczne reszty [57]. Nie jest znana specyficzność hydrofobowego miejsca S2' poza tym, że stwierdzono brak aktywności CatB w stosunku do substratów zawierających prolinę w P2'/P1' oraz argininę w P2' [53]. Wykazano także małą tolerancję dla glicyny w P2' [63]. Zamykająca pętla, charakterystyczna i unikalna dla CatB struktura, w dużej mierze określa katalityczny charakter białka, wpływając zarówno na jego egzo- jak i endopeptydazową aktywność [64, 65]. Wewnątrz lizosomu (pH ok. 4.5-5.5) CatB wykazuje głównie aktywność dipeptydylo karboksypeptydazową, zaś optimum aktywności endopeptydazowej enzymu występuje przy pH = 7.4 [55, 66-68]. W związku z tym, że zamykająca pętla kodowana jest przez pojedynczy ekson (ekson 7) można przypuszczać, że insercja lub delecja tego eksonu w obrębie genu-przodka cysteinowych proteaz doprowadziła do powstania odrębnych grup proteaz [38, 69]. Analiza strukturalna cząsteczki CatB wykazała, że dipeptydylo karboksypeptydazowa aktywność tej proteazy wynika z przestrzennego umiejscowienia zamykającej pętli w obrębie centrum aktywnego enzymu [53, 64]. Zamykająca pętla blokuje dostęp dwóch C-końcowych reszt substratu od centrum aktywnego, zasłaniając miejsca S2' i S3' [53, 65]. Dodatkowo naładowane pierścienie imidazolowe dwóch kluczowych reszt wchodzących w skład zamykającej pętli, His110 i His111, oddziałują z C-końcową karboksylową grupą substratu [53].

Degradacja tak związanego substratu polega na odcięciu C-końcowego dipeptydu. Położenie zamykającej pętli w dojrzałej cząsteczce CatB stabilizowane jest głównie przez mostki solne tworzone między His110 a Asp22 oraz Arg116 a Asp224, dzięki czemu struktura ta znajduje się w bliskości centrum aktywnego [53]. Taka konformacja nazwana została „zamkniętą” w odróżnieniu od „otwartej”, obserwowanej w cząsteczce prokatepsyny B z przyłączonym proregionem [70]. Różnice w trzeciorzędowej strukturze prokatepsyny B i dojrzałego enzymu wynikają przede wszystkim z obecności proregionu, którego przyłączenie do pro-CatB związane jest z odmiennym przestrzennym ułożeniem zamykającej pętli w cząsteczce proCatB. Prosegment na całej swej długości jest połączony z miejscami wiązania w szczelinie centrum aktywnego proCatB podobnie jak polipeptydowy substrat z dojrzałą CatB, lecz w odwrotnym kierunku [70]. Takie przyłączenie propeptydu możliwe jest dzięki odchyleniu na zewnątrz zamykającej pętli, w szczególności jej górnej części [70].

Porównanie zamkniętej i otwartej struktury CatB dało podstawę do prób wyjaśnienia mechanizmów wiązania i degradacji substratów białkowych, oraz stało się źródłem szeregu hipotez dotyczących roli zamykającej pętli w aktywności katepsyny B. Bezpośrednich dowodów na związek zamykającej pętli z egzo-peptydazową aktywnością CatB dostarczyły badania aktywności jej zmienionej genetycznie formy. Dokonano delecji części genu kodującego ludzką CatB, w wyniku ekspresji tego genu w komórkach drożdży *S. cerevisiae* powstała zmutowana forma katepsyny B (nazywana dalej M1), pozbawiona części zamykającej pętli [64]. W badaniach nad aktywnością egzo-peptydazową mutanta M1 i katepsyny B typu dzikiego w stosunku do substratu dansyl-Phe-Arg-Phe(NO₂)-Leu wykazano zupełną utratę aktywności egzo-peptydazowej mutanta, podczas gdy katepsyna B typu dzikiego ma aktywność egzo-peptydazową z wartością $k_{cat}/K_m = 432,000 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ [64]. Zmieniona forma CatB wykazuje także 1.6-krotnie zmniejszoną wartość k_{cat}/K_m dla substratu Cbz-Phe-Arg-MCA w stosunku do CatB typu dzikiego (Tabela 1) [64]. Poza różnicami w aktywności egzo-peptydazowej, zmutowana CatB wykazuje większą wrażliwość na temperaturę, co świadczy o tym, że zamykająca pętla ma również udział w stabilizowaniu struktury enzymu [64]. Zaobserwowano również różnice w prowadzonej *in vitro* autoaktywacji proenzymów M1 i CatB-M1 ulega całkowitej aktywacji po pięciu dniach, CatB po jednodniowej inkubacji [64].

Obecność zamykającej pętli, jak opisano powyżej, determinuje egzoptydazowe właściwości CatB. Zbadano także jej związek z endopeptydazową aktywnością enzymu analizując formy CatB powstałe przez wprowadzenie do genu kodującego ludzką katepsynę B mutacji punktowych dotyczących reszt aminokwasowych, które zaangażowane są w związanie zamykającej pętli z cząsteczką enzymu [65]. Katepsyna B, w porówna-

się na całej długości centrum aktywnego enzymu, lecz położenie zamykającej pętli utrudnia tego typu interakcję z substratem [65]. Endopeptydazowa aktywność CatB wymaga więc takiej zmiany położenia zamykającej pętli, aby substrat mógł bez przeszkód oddziaływać z centrum aktywnym. Na podstawie wyników badań krystalograficznych prokatepsyny B z przyłączonym proregionem zaproponowano, że zamykająca pętla jest elementem, który może zmieniać

Tabela 1

Aktywności enzymatyczne CatB, zmutowanych form CatB i papainy przy pH = 6.0. M1 — mutant CatB bez fragmentu zamykającej pętli; Asp2-2Ala/His110Ala/Arg116Ala — mutant CatB z mutacjami zmniejszającymi związanie zamykającej pętli z cząsteczką enzymu. Znakiem # oznaczono hydrolizowane wiązanie peptydowe w obrębie substratu.

Substrat	Enzym	k_{cat}/K_m [$M^{-1} s^{-1}$]	Piśmiennictwo
Cbz-Phe-Arg#MCA	katepsyna B	422 000	[64]
	M1	261 000	[64]
	papaina	863 000	[65]
dansyl-Phe-Arg#Phe(NO ₂)-Leu	katepsyna B	432 000	[64]
	M1	0	[64]
Abz-Ala-Phe-Arg#Ser-Ala-Ala-Gln-EDDnp	katepsyna B	1950	[65]
	Asp22Ala/His110Ala/Arg116Ala	928 000	[65]
	papaina	3 300 000	[65]
Abz-Glu-Val-Val-Ala#Gly-Ala-EDDnp	katepsyna B	3 000	[65]
	Asp22Ala/His110Ala/Arg116Ala	1 635 000	[65]
	papaina	14 830 000	[65]

niu z papainą czy katepsyną L, ma bardzo niewielką aktywność wobec substratów takich jak Abz-Ala-Phe-Arg-Ser-Ala-Ala-Gln-EDDnp i Abz-Glu-Val-Val-Ala-Gly-Ala-EDDnp, hydrolizowanych dzięki endopeptydazowej aktywności (wartość k_{cat}/K_m ok. 1700 razy mniejsza niż dla papainy) [65]. Mutant Asp22Ala/His110Ala/Arg116Ala, w którym reszty Asp22, His110 i Arg116 zastąpiono resztami alaniny, znosząc tym samym oddziaływania stabilizujące zamykającą pętlę w pozycji zamkniętej, hydrolizuje te substraty z wartością k_{cat}/K_m ponad 500 razy wyższą niż CatB typu dzikiego (Tabela 1) [65].

Analizując przedstawione wyżej wyniki badań można stwierdzić, że obecność zamykającej pętli powoduje niską endopeptydazową aktywność katepsyny B i jednocześnie jest przyczyną dipeptydylo karboksypeptydazowej aktywności enzymu. CatB wykazuje endopeptydazową aktywność jedynie wobec substratów, których łańcuch peptydowy przyłącza

położenie w obrębie cząsteczki enzymu w przypadku przyłączania endopeptydazowego substratu [65,70]. Ostateczną weryfikacją powyższej hipotezy mogłyby być wyniki badań aktywności CatB z wprowadzoną mutacją powodującą zablokowanie zamykającej pętli w konformacji „zamkniętej”, co powinno powodować całkowity brak aktywności endopeptydazowej enzymu [65].

Analiza budowy i szlaków biosyntezy enzymu jest warunkiem koniecznym dla poznania wpływu aktywności katepsyny B na powstawanie i przebieg szeregu chorób. Struktura CatB determinuje nie tylko aktywność enzymatyczną, ale również oddziaływanie enzymu z inhibitorami. Badanie aktywności katepsyny B staje się czołową metodą diagnostyczną w przypadkach chorób nowotworowych, zaś stosowanie syntetycznych lub naturalnych inhibitorów CP może być jednym ze sposobów eliminowania patologicznej aktywności CatB [71].

V. Rola katepsyny B w procesie przerzutowania nowotworów

Enzymy proteolityczne — w szczególności zaś lizosomalne proteazy cysteinowe — przyciągają uwagę już nie tylko biologów molekularnych i biochemików, ale również lekarzy, a to ze względu na wielość stanów chorobowych, w których obserwuje się patologiczną ekspresję, lokalizację i aktywność tych enzymów [37]. W przypadku wielu ludzkich nowotworów katepsyna B jest zaangażowana w proces inwazji nowotworowej, czyli w tworzenie przerzutów (metastaz) nowotworów złośliwych [1, 2, 10, 36, 45]. Wpływ CatB na przerzutowanie nowotworów wiąże się ściśle z poziomem naturalnych inhibitorów regulujących aktywność cysteinowych proteaz [37, 72]. Inhibitory te klasyfikowane są jako trzy główne grupy białek: cystatyny, stefiny, kininogeny [72-75]. Budowa endogennych inhibitorów i ich wpływ na regulację proteaz cysteinowych stanowią zagadnienia wymagające szerszego omówienia, jednak wykraczające znacznie poza zamierzony zakres tematów przedstawionych w niniejszym opracowaniu.

Nadekspresję mRNA kodującego katepsynę B stwierdzono w komórkach ludzkich guzów m.in. mózgu [76], tarczycy [77] i okrężnicy [78]. W przypadku komórek raka okrężnicy zaobserwowano czterokrotnie wyższy poziom mRNA kodującego CatB niż w odpowiednich nie zmienionych nowotworowo komórkach [78]. Podobnie jest w innych typach nowotworów [36]. Oprócz badań dotyczących nadekspresji CatB na poziomie mRNA analizowano poziom białka i aktywności enzymatycznej katepsyny B, i ich podwyższone wartości stwierdzono w przypadku nowotworów piersi [79], mózgu [76, 80], płuc [21], żołądka, tarczycy, szyjki macicy, jajnika i innych narządów [14, 45]. Poziom aktywności CatB w przypadku inwazyjnego raka okrężnicy i innych nowotworów podwyższony jest szczególnie na obrzeżach guza, gdzie aktywność proteolityczna katepsyny B jest przyczyną degradacji białek macierzy pozakomórkowej (ECM, ang. *extracellular matrix*) Umożliwia to komórkom nowotworowym atakowanie sąsiednich tkanek oraz tworzenie odległych wtórnych ognisk nowotworowych [81]. Proces powstawania metastaz wymaga przedostania się komórek nowotworowych z guza pierwotnego do naczyń krwionośnych lub chłonnych, co jest możliwe po pokonaniu przez komórki nowotworowe bariery, jaką jest błona podstawna. Błona podstawna zbudowana jest z kolagenu typu IV, będącego szkieletem całej struktury, oraz z glikoprotein takich jak laminina i entaktyna [82]. Według hipotezy zaproponowanej

przez L i o t t a (1986) degradacja błony podstawnej w procesie inwazji nowotworowej następuje w trzech etapach:

- komórka nowotworowa wiąże się za pomocą odpowiednich receptorów na swojej powierzchni ze składnikiem błony podstawnej — lamininą;
- związana z błoną podstawną komórka nowotworowa wydziela enzymy hydrolityczne, lokalnie degradujące składniki błony podstawnej;
- komórka nowotworowa przemieszcza się w obszar nie ograniczony już błoną podstawną [82].

Opisany powyżej związek CatB z procesem inwazji nowotworowej poprzez degradację ECM znajduje potwierdzenie dzięki wynikom licznych obserwacji klinicznych. Wykazano ścisłą korelację podwyższonego poziomu aktywności CatB z inwazyjnym potencjałem komórek nowotworowych w przypadku m.in. nowotworów płuc, piersi, skóry [9, 14, 22, 83, 84]. Ekspresja ludzkiej CatB w nieinwazyjnych mysich komórkach nowotworowych B16F1 powoduje 3 do 5-krotny wzrost potencjału inwazyjnego tych komórek względem modelu ECM (Matrigel), co także potwierdza związek CatB z procesem tworzenia metastaz [9]. Aktywność katepsyny B jest także związana z angiogenezą, czyli procesem powstawania nowych naczyń krwionośnych w obrębie guza nowotworowego [85]. Angiogeneza jest bardzo ważnym elementem rozwoju nowotworu, ponieważ bez rozwoju nowych naczyń krwionośnych z krwią dostarczającą tlen do wnętrza guza i odprowadzającą produkty przemiany materii, rozmiar guza ograniczony jest jedynie do około 2 mm [86]. W początkowych stadiach unaczynienia guza, niezbędna jest aktywność proteazowa dla umożliwienia procesu powstawania nowych naczyń krwionośnych, w którym bezpośredni udział biorą metaloproteinazy [32]. Katepsyna B pośrednio ułatwia tworzenia naczyń włosowatych guza przez degradację, a tym samym inaktywację inhibitorów metaloproteinaz [32].

VI. Wewnątrzkomórkowa i pozakomórkowa aktywność katepsyny B w nowotworach

Zarówno obserwacje guzów nowotworowych jak i badania aktywności CatB względem elementów błony podstawnej *in vitro* wskazują, że katepsyna B jest zaangażowana w proces inwazji nowotworowej, a jej proteolityczna aktywność jest pośrednią lub bezpośrednią przyczyną degradacji błony podstawnej i macierzy pozakomórkowej [87]. Pośredni udział CatB w wymienionych procesach polega na aktywowaniu innych proteaz, degradujących składniki błony podstawnej. Katepsyna B może aktywo-

wać uPA (aktywator plazminogenu typu urokinazowego), który z kolei aktywuje plazminogen do plazminy [30]. Plazmina zdolna jest do degradacji m.in. fibryny i lamininy oraz do aktywowania szeregu metaloproteaz, których substratem jest kolagen IV [10, 80, 88]. Szerzej analizowany jest jednak bezpośredni wpływ CatB na tworzenie metastaz związany z faktem, że substratem CatB mogą być takie składniki macierzy pozakomórkowej, jak laminina, kolagen typu I, II, III, IV, fibronektyna [45, 89]. Komórki nowotworowe mogą pochłaniać częściowo zdegradowane komponenty ECM na drodze endocytozy i wewnątrzkomórkowo trawić je przy udziale katepsyny B [2, 36]. Wyniki najnowszych badań wskazują, że wewnątrzkomórkowa CatB odgrywa znaczącą rolę w degradacji błony podstawnej i ECM [9]. Katepsyna B może być także wydzielana na zewnątrz komórek nowotworowych i w zależności od rodzaju nowotworu sekrecja obejmuje aktywną CatB lub nieaktywną (prekursorową) formę białka [2, 90]. Początkowo sądzono, że obserwowana zewnątrzkomórkowa aktywność CatB pochodzi z martwych komórek, które uwolniły lizosomalną zawartość. Ostatnio jednak wykazano sekrecję aktywnej CatB z żywych komórek ludzkiego raka piersi [55] i stwierdzono podwyższony poziom CatB we wczesnych stadiach guza, bez wykrycia nekrozy tkanek [45]. Sekrecja katepsyny wynika prawdopodobnie z zaburzeń w wewnątrzkomórkowym transporcie CatB do lizosomów lub jest skutkiem uwalniania zawartości lizosomów poza komórkę, lecz dokładne mechanizmy odpowiadające za taki transport CatB nie są jeszcze znane [36]. Aktywną CatB znajduje się w płynach ustrojowych kontaktujących się z guzem, np. w przypadku nowotworów jajnika i płuc. Wysoki poziom CatB obserwuje się też w surowicy i moczu pacjentów cierpiących na nowotwory tworzące metastazy [2]. Analizując wyniki badań stwierdzające znaczny wzrost aktywności CatB w przypadku guzów nowotworowych można by przypuszczać, że zmiana aktywności spowodowana jest istnieniem odmiennej, specyficznej dla komórek nowotworowych formy katepsyny B. Nie można jednoznacznie rozstrzygnąć czy istnieje właściwa tylko dla nowotworów forma CatB. Wykazano, że zarówno w komórkach nowotworowych, jak i w odpowiednich zdrowych komórkach występują formy CatB o masach cząsteczkowych ok. 31 kDa (forma jednołańcuchowa) oraz ok. 26 kDa (ciężki łańcuch formy dwułańcuchowej), co nie potwierdza istnienia odmiennej formy CatB w nowotworach [91, 92], chociaż w ludzkich i mysich komórkach nowotworowych znaleziono izoformy CatB różniące się warto-

ścią punktu izoelektrycznego od tych w komórkach zdrowych. W komórkach nowotworowych większość stanowią formy o niskiej wartości pI (4.82-4.33), charakteryzujące się znacznie większą aktywnością niż izoformy CatB w zdrowych komórkach [36].

Niezwykle intrygującym zjawiskiem jest występowanie lizosomalnej proteazy, jaką jest CatB, na powierzchni błony komórkowej komórek nowotworowych [56, 93]. Aktywność CatB związanej z błoną komórkową komórek nowotworów złośliwych opisano w wielu przypadkach nowotworów mysich i ludzkich [45, 94, 95]. Zaproponowano, że właśnie CatB w asocjacji z błoną komórkową ma pierwszorzędne znaczenie w procesie rozkładu elementów ECM i inwazji nowotworowej, zaś wpływ CatB uwalnianej na zewnątrz komórek na inwazję nowotworu jest znikomy [94]. Dotychczas nie znane są przyczyny ani mechanizmy transportu CatB do błony komórkowej. Przypuszcza się, że jest to wtórny transport z lizosomów [91]. Po transfekcji ludzkich komórek, w których obserwuje się fizjologiczną (lizosomalną) lokalizację katepsyny B, onkogenem *c-Ha-ras* wykrywa się na ich powierzchni CatB związaną z błoną komórkową [95]. Wykazano, że obie formy katepsyny B — lizosomalna i związana z błoną komórkową — wykazują podobną aktywność enzymatyczną względem syntetycznych substratów [91]. Dotąd nie w pełni poznano mechanizmy asocjacji katepsyny B z błoną, jednak wyniki najnowszych badań dostarczyły szeregu interesujących informacji. Wiadomo, że ludzka prokatepsyna B oddziałuje z lekkim łańcuchem (p11) tetrameru aneksyny II na powierzchni komórek nowotworowych *in vitro* [96]. Ostatnio odkryto, że katepsyna B może być specyficznie wiązana przez glikoaminoglikany znajdujące się w błonie komórkowej, takie jak heparyna i siarczan heparanu. Oddziaływanie to powoduje zmiany konformacyjne CatB polegające na zmniejszeniu zawartości helisy α w strukturze cząsteczki białka. Ponadto, związana CatB charakteryzuje się zmniejszoną aktywnością egzoptydazową względem syntetycznych substratów [97]. Siarczan heparanu może wiązać się z tetramerem aneksyny II. Zaproponowano więc hipotetyczny model wiązania CatB z błoną komórkową [97]. Model ten zakłada, że znajdujący się w błonie komórkowej tetramer aneksyny II przyłącza siarczan heparanu, który z kolei specyficznie wiąże się z cząsteczką katepsyny B [97]. Nie wiadomo jednak, czy jest to jedyny sposób interakcji CatB z błoną oraz czy zmiana aktywności tak związanej katepsyny ma istotne konsekwencje w kontekście propagacji nowotworu. Problemy te wy-

magają dalszych badań, w których należy brać pod uwagę nie tylko obserwacje kliniczne, ale również wykorzystać wiedzę dotyczącą syntezy, kierowania i budowy cząsteczkowej katepsyny B.

VII. Podsumowanie

Wyniki badań prowadzonych w laboratoriach na całym świecie wskazują na korelację podwyższonego poziomu aktywności proteolitycznej CatB i zmian poziomu jej endogennych inhibitorów ze stadiami rozwoju nowotworów złośliwych różnych typów [2, 14, 36, 73, 80, 83]. Ten fakt pozwolił na wykorzystanie analizy poziomu aktywności CatB w klinicznej diagnostyce wielu chorób nowotworowych, umożliwiając także określenie ryzyka wystąpienia przerzutów i nawrotów choroby po usunięciu guza pierwotnego [10, 14, 22, 24, 76, 80, 83, 98]. Kluczowa rola lizosomalnych enzymów proteolitycznych (w tym w znacznym stopniu katepsyny B) w procesie przerzutowania jest głównym powodem identyfikacji substratów hydrolizowanych w procesie inwazji oraz analizy zmian w transporcie proteaz w komórce nowotworowej [36]. Szczegółowe poznanie mechanizmów i określenie czynników mających wpływ na patologiczne kierowanie CatB poza komórkę lub na jej powierzchnię mogłoby przyczynić się do opracowania metod zapobiegania wystąpieniu przerzutów. Zaobserwowano udział CatB w apoptozie nie zmienionych chorobowo komórek, nie wiadomo jednak, jak i czy zmiana lokalizacji CatB z wewnątrzkomórkowej na zewnątrzkomórkową wpływa na apoptozę w komórkach nowotworowych [15, 34]. Zaburzenie regulacji apoptozy przez kierowaną na zewnątrz komórek rakowych CatB mogłoby przyczynić się do propagacji procesu nowotworowego w tych komórkach. Coraz więcej sygnałów w literaturze światowej wskazuje także na możliwość niezwykle skutecznego wykorzystania naturalnych i syntetycznych inhibitorów proteaz cysteinowych w walce z nowotworami [17, 19, 21, 72]. U podstaw skutecznej terapii opartej na blokowaniu aktywności proteolitycznej tych enzymów leży dokładne poznanie ich regulacji (na poziomie transkrypcji, składania transkryptu, translacji, obróbki potranslacyjnej i kierowania do lizosomów), budowy cząsteczkowej oraz wpływu ewentualnych zmian konformacyjnych powodowanych przez interakcję z błoną komórkową i/lub pozakomórkową lokalizację na aktywność enzymatyczną.

Artykuł otrzymano 20 sierpnia 2001

Zaakceptowano do druku 11 lutego 2002

Piśmiennictwo

1. Schwartz MK (1995) *Clin Chim Acta* **237**: 67-78
2. Kos J, Lah TT (1998) *Oncology Reports* **5**: 1349-1361
3. Song J, Xu P, Xiang H, Su Z, Storer AC, Ni F (2000) *FEBS Lett* **475**: 157-162
4. Koblinski JE, Ahram M, Sloane BF (2000) *Clin Chim Acta* **291**: 113-135
5. Frosch BA, Berquin I, Emmert-Buck MR, Moin K, Sloane BF (1999) *APMIS* **107**: 28-37
6. Turk B, Turk D, Turk V (2000) *Biochim Biophys Acta* **1477**: 98-111
7. Haczyńska H, Warwas M (1994) *Post Hig Med Dośw* **48**: 729-743
8. Olszewska D, Drewna T, Makarewicz R, Drewna J, Woźniak A, Maciak R (2001) *Pol Merk Lek* **55**: 65-70
9. Szpaderska AM, Frankfater A (2001) *Cancer Res* **61**: 3493-3500
10. Duffy MJ (1996) *Clinical Cancer Res* **2**: 613-618
11. Sameni M, Dosesescu J, Sloane BF (2001) *Biol Chem* **382**: 785-788
12. Taggart CC, Lowe GJ, Greene CM, Mulgrew AT, O'Neil SJ, Levine RL, McElvaney NG (2001) *J Biol Chem* **276**: 33345-33352
13. Premzl A, Puizdar V, Zavašnik-Bergant V, Kopicar-Jerala N, Lah TT, Katunuma N, Sloane BF, Turk V, Kos J (2001) *Biol Chem* **382**: 853-857
14. Lah TT, Kos J (1998) *Biol Chem* **379**: 125-130
15. Reinheckel T, Deussing J, Roth W, Peters C (2001) *Biol Chem* **382**: 735-741
16. Barrett AJ, Kembhavi A, Brown MA, Kirschke H, Knight CG, Tamai M, Hanada K (1982) *Biochem J* **201**: 189-198
17. Turk D, Podobnik M, Popović T, Katunuma N, Bode W, Huber R, Turk V (1995) *Biochemistry* **34**: 4791-4797
18. Turk D, Podobnik M, Kuhelj R, Dolina M, Turk V (1996) *FEBS Lett* **384**: 211-214
19. Siewiński M, Gutowicz J, Zarzycki A, Mikulewicz W (1996) *Cancer Biotherapy and Pharmaceuticals* **11**: 169-176
20. Berdowska I, Siewiński M, Zarzycka-Reich A, Jarmulowicz J, Noga L (2001) *Med Sci Monit* **7**: 675-679
21. Zore I, Krašovec M, Cimerman N, Kuhelj R, Werle B, Nielsen HJ, Brünner N, Kos J (2001) *Biol Chem* **382**: 805-810
22. Inoue T, Ishida T, Sugio K, Sugimachi K (1994) *Cancer Res* **54**: 6133-6136
23. Barrett AJ, Rawlings ND (2001) *Biol Chem* **382**: 727-733
24. Aronson NN, Barrett AJ (1978) *Biochem J* **171**: 759-765
25. Qian F, Chan S, Gong Q, Bajkowski AS (1991) *Bio-med Biochim Acta* **50**: 531-540
26. Brix K, Linke M, Tepel C, Herzog V (2001) *Biol Chem* **382**: 717-725
27. Okamura-Oko Y, Zhang S, Callahan JW, Murata M, Oshima A, Suzuki Y (1997) *FEBS Lett* **419**: 231-234
28. Mizuochi T, Yee ST, Kasai M, Kakiuchi T, Muno D, Kominami E (1994) *Immunol Lett* **43**: 189-193
29. Deussing J, Roth W, Saftig P, Peters C, Ploegh HL, Villadangos JA (1998) *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 4516-4521
30. Kobayashi H, Schmitt M, Goretzki L, Chuchowski N, Calvete J, Kramer M, Günzler WA, Jänicke F, Graeff H (1991) *J Biol Chem* **266**: 5147-5152
31. Authier F, Métioui M, Bell AW, Mort JS (1999) *J Biol Chem* **274**: 33723-33731
32. Kostoulas G, Lang A, Nagase H, Baici A (1999) *FEBS Lett* **455**: 286-290
33. Halangk W, Lerch MM, Brandt-Nedelev B, Roth W, Ruthenbuenger M, Reinheckel T, Domschke W, Lippert H, Peters C, Deussing J (2000) *J Clin Invest* **106**: 773-781

34. Guicciardi ME, Deussing J, Miyoshi H, Bronk SF, Svingen PA, Peters C, Kaufmann SH, Gores GJ (2000) *J Clin Invest* **106**: 1127-1137
35. Gray J, Haran MM, Schneider K, Vesce S, Ray AM, Owen D, White IR, Cutler P, Davis JB (2001) *J Biol Chem* **276**: 32750-32755
36. Yan S, Sameni M, Sloane B F (1998) *Biol Chem* **379**: 113-123
37. Turk B, Turk V, Turk D (1997) *Biol Chem* **378**: 141-150
38. Mordier SB, B chet DM, Roux M-P, Obled A, Ferrara M (1995) *Eur J Biochem* **229**: 35-44
39. Fong D, Chan MM, Hsieh WT, Menninger JC, Wart DC (1992) *Hum Genet* **89**: 10-12
40. Wang X, Chan SJ, Eddy RL, Byers MG, Fukushima Y, Henry LL, Steiner DF, Shows TB (1988) *Cytogenet Cell Genet* **46**: 710-711
41. Gong Q, Chan SJ, Bajkowski AS, Steiner DF, Frankfater A (1993) *DNA Cell Biol* **12**: 299-309
42. Berquin IM, Cao L, Fong D, Sloane BF (1995) *Gene* **159**: 143-149
43. Berquin IM, Sloane BF (1996) *Adv Exp Med Biol* **389**: 281-294
44. Chan SJ, San Segundo B, McCormick MB, Sloane BF (1986) *Proc Natl Acad Sci USA* **83**: 7721-7725
45. Sloane BF, Rozhin J, Hatfield JS, Crissman JD, Honn KV (1987) *Exp Cell Biol* **55**: 209-224
46. Kang JX, Bell J, Leaf A, Beard RL, Chandraratna RAS (1998) *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 13687-13691
47. Mach L, St we K, Hagen A, Ballaun C, Gl ssl J (1992) *Biochem J* **282**: 577-582
48. Nishimura Y, Kawabata T, Kato L K (1988) *Arch Biochem Biophys* **261**: 64-71
49. Hara K, Kominami E, Katunuma N (1988) *FEBS Lett* **231**: 229-231
50. Mach L, Schwihla H, St we K, Rowan A D, Mort J S, Gl ssl J (1993) *Biochem J* **293**: 437-442
51. Rowan AD, Mason P, Mach L, Mort J S (1992) *J Biol Chem* **267**: 15993-15999
52. Takahashi K, Isemoru M, Ikenaka T (1979) *J Biochem* **85**: 1053-1060
53. Musil D, Zu i  D, Turk D, Engh RA, Mayr I, Huber R, Popovi  T, Turk V, Towatari T, Katunuma N, Bode W (1991) *EMBO J* **10**: 2321-2330
54. Chen J-M, Dando PM, Rawlings ND, Brown MA, Young NE, Stevens RA, Hewitt F, Watts C, Barrett AJ (1997) *J Biol Chem* **272**: 8090-8098
55. Linebaugh BE, Sameni M, Day NA, Sloane BF, Keppler D (1999) *Eur J Biochem* **264**: 100-109
56. Moin K, Cao L, Day NA, Koblinski JE, Sloane BF (1998) *Biol Chem* **379**: 1093-1099
57. Jia Z, Hasnain S, Hirama T, Lee X, Mort JS, To R, Huber CP (1995) *J Biol Chem* **270**: 5527-5533
58. Schechter I, Berger A (1967) *Biochem Biophys Res Commun* **27**: 157-162
59. Barrett AJ, Kirschke H (1981) *Methods Enzymol* **80**: 535-561
60. Hasnain S, Huber CP, Muir A, Rowan AD, Mort JS (1992) *Biol Chem Hoppe Seyler* **373**: 413-418
61. Hasnain S, Hirama T, Huber CP, Mason P, Mort JS (1993) *J Biol Chem* **268**: 235-240
62. Taralp A, Kaplan H, Sytwu I-I, Vlattas I, Rohacek R, Knap AK, Hirama T, Huber CP, Hasnain S (1995) *J Biol Chem* **270**: 18036-18043
63. Br mme D, Kirschke H (1993) *FEBS Lett* **322**: 211-214
64. Illy C, Quraishi O, Wang J, Purisima E, Vernet T, Mort JS (1997) *J Biol Chem* **272**: 1197-1202
65. N gler DK, Storer AC, Portaro FCV, Carmona E, Juliano L, Menard R (1997) *Biochemistry* **36**: 12608-12615
66. Polg r L, Csoma C (1987) *J Biol Chem* **262**: 14448-14453
67. Pohl J, Davinic S, Bl ha I, Štrop P, Kostka V (1987) *Anal Biochem* **165**: 96-101
68. Khouri HE, Plouffe C, Hasnain S, Hirama T, Storer AC, Menard R (1991) *Biochem J* **275**: 751-757
69. Hughes AL (1994) *Mol Phyl Evol* **3**: 310-321
70. Cygler M, Sivaraman J, Grochulski P, Coulombe R, Storer AC, Mort JS (1996) *Structure* **15**: 405-416
71. Siewiński M, Gutowicz J, Kielan W, Bolanowski M (1994) *Oncology* **446-449**
72. Henskens YMC, Veerman ECI, Nieuw Amerongen AV (1996) *Biol Chem Hoppe Seyler* **377**: 71-86
73. J rvinen M, Rinne A, Hopsu-Havu VK (1987) *Acta Histochem* **82**: 5-18
74. Lah TT, Kokali-Kunovar M, Turk V (1990) *Biol Chem Hoppe Seyler* **371**: 199-203
75. Anastasi A, Brown MA, Kembhavi AA, Niclkin MJH, Sayers CA, Sunter DC, Barrett AJ (1983) *Biochem J* **211**: 129-138
76. Rempel SA, Rosenblum ML, Mikkelsen T, Yan P-S, Ellis KD, Golembieski WA, Sameni M, Rozhin J, Zeigler G, Sloane BF (1994) *Cancer Res* **54**: 6027-6031
77. Shuja S, Murnane MJ (1996) *Int J Cancer* **66**: 420-426
78. Murnane MJ, Sheahan K, Ozdemirli M, Shuja S (1991) *Cancer Res* **51**: 1137-1142
79. Recklies AD, Tiltman KJ, Stoker TAM, Poole AR (1980) *Cancer Res* **40**: 550-556
80. Rooprai HK, McCormick D (1997) *Anticancer Res* **17**: 4151-4162
81. Emmert-Buck MR, Roth MJ, Zhuang Z, Campo E, Rozhin J, Sloane BF, Liotta LA, Stetler-Stevenson WG (1994) *Am J Pathol* **145**: 1285-1290
82. Liotta LA (1986) *Cancer Res* **46**: 1-7
83. Budihna M, Strojjan P, Šmid L, Škrk J, Vrhovec I, Župevc A, Rudolf Z, Žargi M, Kraškovec M, Svetic B, Kopitar-Jerala N, Kos J (1996) *Biol Chem Hoppe Seyler* **377**: 385-390
84. Khan A, Krishna M, Baker SP, Malhotra R, Banner BF (1998) *Arch Pathol Lab Med* **122**: 172-177
85. Keppler D, Sameni M, Moin K, Mikkelsen T, Diglio CA, Sloane BF (1996) *Biochem Cell Biol* **74**: 799-810
86. Kerbel R, Greig R, Frost P (1990) *Cancer Metastasis Rev* **9**: 171-282
87. Guinec N, Dalet-Fumeron V, Pagano M (1993) *Biol Chem Hoppe Seyler* **374**: 1135-1146
88. Schmitt M, J nicke F, Moniwa N, Chucholowski N, Pache L, Graeff H (1992) *Biol Chem Hoppe Seyler* **373**: 611-622
89. Lah TT, Buck MR, Honn KV, Crissman JD, Rao NC, Liotta LA, Sloane BF (1989) *Clin Exp Metastasis* **7**: 461-468
90. Rozhin J, Sameni M, Zeigler G, Sloane BF (1994) *Cancer Res* **54**: 6517-6525
91. Moin K, Day NA, Sameni M, Hasnain S, Hirama T, Sloane BF (1992) *Biochem J* **285**: 427-434
92. Werle B, Ebert W, Klein W, Spiess E (1994) *Anticancer Res* **14**: 1169-1176
93. Sloane BF, Rozhin J, Johnson K, Taylor H, Crossman JD, Honn KV (1986) *Proc Natl Acad Sci USA* **83**: 2483-2487
94. Persky B, Ostrowski LE, Pagast P, Ashan A, Schultz RM (1986) *Cancer Res* **46**: 4129-4134
95. Sloane BF, Moin K, Sameni M, Tait LR, Rozhin J, Ziegler G (1994) *J Cell Science* **107**: 373-384
96. Mai J, Finley RL Jr, Waisman DM, Sloane BF (2000) *J Biol Chem* **275**: 12806-12812
97. Almeida PC, Nantes IL, Chagas JR, Rizzi CCA, Faljoni-Alario A, Carmona E, Juliano L, Nader HB, Tersariol ILS (2001) *J Biol Chem* **267**: 944-951
98. Kos J, Šmid A, Kraškovec M, Svetic B, Lenar i  B, Vrhovec I, Škrk J, Turk V (1995) *Biol Chem Hoppe Seyler* **376**: 401-405

Molekularne podstawy działania arszeniku w komórkach białaczki promielocytowej

Molecular base of arsenic action in promyelocytic leukemia cells

ROBERT WYSOCKI¹, EWA WIŚNIEWSKA²

Spis treści:

- I. Historia medyczna arszeniku
- II. Wprowadzenie arszeniku do leczenia pacjentów z nawrotami ostrej białaczki promielocytowej
- III. Rola receptora kwasu retinowego oraz białka PML w patogenezie ostrej białaczki promielocytowej
 - III-1. Mechanizm regulacji transkrypcji genów odpowiedzialnych za różnicowanie komórek mieloidalnych przez receptor kwasu retinowego
 - III-2. Mutacja w genie kodującym białko białaczki promielocytowej PML prowadzi do zaburzenia regulacji cyklu komórkowego i apoptozy
- IV. Leczenie ostrej białaczki promielocytowej kwasem retinowym polega na aktywacji procesu różnicowania komórek nowotworowych w neutrofile
- V. Molekularny mechanizm działania arszeniku w komórkach białaczki promielocytowej
 - V-1. Częściowe różnicowanie się komórek białaczkowych indukowane przez arszenik spowodowane jest degradacją chimerycznych białek złożonych z receptora kwasu retinowego i białka białaczki promielocytowej
 - V-2. Arszenik indukuje apoptozę poprzez zwiększenie ilości nadtlenku wodoru w komórkach białaczkowych
- VI. Arszenik hamuje wzrost różnych typów komórek nowotworowych

Contents:

- I. Medical history of arsenic
- II. Introduction of arsenic into the treatment of relapsed acute promyelocytic leukemia patients
- III. Role of retinoic acid receptor and PML protein in acute promyelocytic leukemia pathogenesis
 - III-1. Mechanism of transcriptional regulation of genes responsible for myeloid cell differentiation by retinoic acid receptor
 - III-2. Mutation in gene encoding promyelocytic leukemia protein PML leads to disorder of cell cycle regulation and apoptosis
- IV. Retinoic acid treatment of acute promyelocytic leukemia consists in activation of cancer cells differentiation into neutrophils
- V. Molecular mechanism of arsenic action in promyelocytic leukemia
 - V-1. Partial differentiation of promyelocytic leukemia cells induced by arsenic is caused by degradation of chimeric proteins consisting of retinoic acid receptor and promyelocytic leukemia protein
 - V-2. Arsenic induces apoptosis through the increase of hydrogen peroxide amount in leukemia cells
- VI. Arsenic inhibits growth of various types of cancer cells

Wykaz stosowanych skrótów: APL — ostra białaczka promielocytowa (ang. *acute promyelocytic leukemia*); ATRA — kwas całkowicie-*trans*-retinowy (ang. *all-trans-retinoic acid*); CRABP — komórkowe białko wiążące kwas retinowy (ang. *cellular RA-binding protein*); GPx — peroksydaza glutationowa; GSH — zredukowany glutation; GST- π — S-transferaza glutationowa; LBD — domena wiążąca ligand w receptorze RAR α (ang. *ligand binding domain*); MAP — kinaza aktywowana mitogenem (ang. *mitogen-activated protein*); MHC — główny kompleks zgodności tkankowej (ang. *major histocompatibility complex*); NB — ziarniste struktury jądrowe zawierające m.in białko PML, synonim POD (ang. *nuclear body*); PARP — polimeraza poli(ADP-rybozy); PML — gen i białko

białaczki promielocytowej (ang. *promyelocytic leukemia*); POD — onkogenna domena PML (ang. *PML oncogenic domain*); $\Delta\Psi m$ — potencjał transbłonowy mitochondrium; RA — kwas retinowy (ang. *retinoic acid*); RAR α — receptor α kwasu retinowego (ang. *retinoic acid receptor α*); RARE — element sekwencji DNA rozpoznawany przez receptory kwasu retinowego (ang. *retinoic acid response element*); RFT — reaktywne formy tlenu; RXR — receptor retinoidu X (ang. *retinoid X receptor*); SOD — dysmutaza ponadtlenkowa.

I. Historia medyczna arszeniku

Arszenik (trójtlenek arsenu; As₂O₃) jest jedną z najbardziej znanych trucizn. Ze względu na brak zapachu i smaku oraz łatwą dostępność, arszeniku użyto do zamordowania wielu znanych postaci historycznych, m.in. Napoleona Bonaparte [1]. Dane epi-

¹Dr, ²studentka; Zakład Genetyki, Instytut Genetyki i Mikrobiologii, Uniwersytet Wrocławski, ul. Przybyszewskiego 63/77, 51-148 Wrocław, e-mail: robby@microb.uni.wroc.pl

demiologiczne wskazują ponadto na związek między obecnością arsenu w wodzie pitnej a zwiększonym ryzykiem zachorowania na raka skóry, płuc, wątroby [2]. Mutagenność i kancerogenność arsenu może wynikać z zaburzenia w komórce procesów usuwających reaktywne formy tlenu, które uszkadzają lipidy, białka oraz DNA [3]. Arsen zwiększa także mutagenność innych karcinogenów, np. poprzez hamowanie naprawy uszkodzeń DNA spowodowanych promieniowaniem ultrafioletowym [4].

Pomimo swej złej reputacji arsenik był stosowany w medycynie od ponad 2400 lat [5]. Arsen był aktywnym składnikiem roztworu Fowlera, który używano od XVIII wieku do leczenia wielu chorób, w tym astmy, płasawicy, wyprysków, pęcherzycy, łuszczycy [6]. Pod koniec XIX wieku po raz pierwszy wykazano wpływ arsenu na liczbę leukocytów u człowieka [6]. Dziesięciodniowa terapia roztworem Fowlera powodowała znaczne obniżenie liczby białek ciała krwi u chorych z przewlekłą białaczką szpikową. Aż do lat trzydziestych XX wieku specyfik ten był podstawą w leczeniu anemii, choroby Hodgkina i białaczek [7]. W 1910 roku niemiecki uczoney Paul Ehrlich i japoński bakteriolog Saha-chiro Hata odkryli zabójcze działanie organicznych związków arsenu na krętki i pierwotniaki, co doprowadziło do opracowania pierwszego skutecznego leku przeciwko kile — salwarsanu [6]. Później arsen zastąpiono chemio- i radioterapią i do niedawna tylko melarsoprol był jedynym lekiem zawierającym arsen dopuszczonym w medycynie i stosowanym do leczenia śpiączki afrykańskiej w jej ostatniej fazie, w której zaatakowany jest centralny układ nerwowy [8].

II. Wprowadzenie arsenu do leczenia pacjentów z nawrotami ostrej białaczki promielocytowej

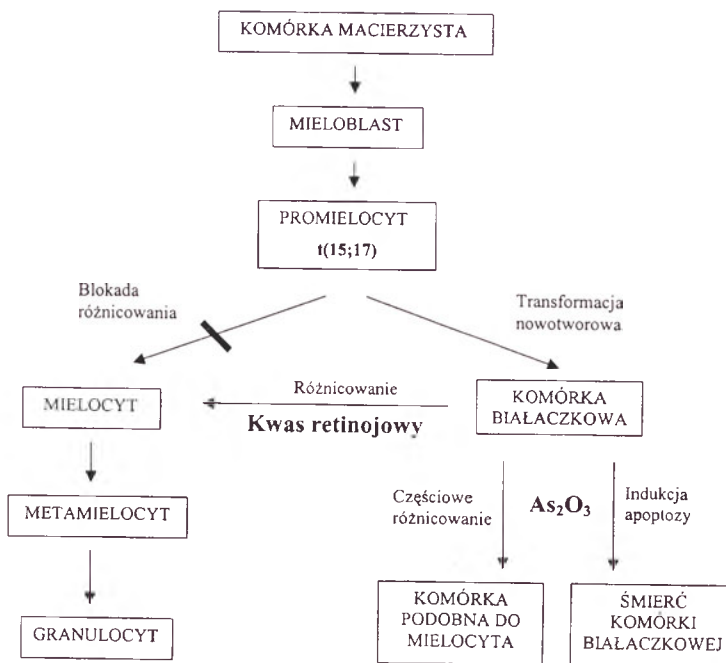
Najnowsza historia arsenu jako leku antynowotworowego rozpoczęła się 30 lat temu w północno-wschodnich Chinach, kiedy grupa lekarzy z uczelni medycznej w Harbinie została wysłana na prowincję, żeby udowodnić wyższość chińskiej medycyny ludowej nad zachodnią [9]. Dzięki tym poszukiwaniom odkryto, że aktywnymi składnikami mikstur stosowanych od wieków do niszczenia mięszi zębowej oraz do leczenia takich chorób jak kiła, reumatyzm, łuszczycyca, są właśnie związki arsenu [10]. Grupa z Harbinu testowała skuteczność arsenu w wielu rodzajach nowotworów, ale najlepsze wyniki uzyskano w przypadku ostrej białaczki promielocytowej — APL (ang. *acute promyelocytic leu-*

kemia) [10, 11]. Podawanie dożylnie arsenu w dawce 10 mg na dzień przez 20-60 dni spowodowało remisję choroby u ponad 65% pacjentów, a u prawie 30% nie nastąpił nawrót choroby przez następne 10 lat [10, 11]. Arsenik okazał się również bardzo skuteczny u chorych z nawrotami ostrej białaczki promielocytowej w formie odpornej na konwencjonalną chemioterapię kwasem całkowicie-*trans*-retinowym — ATRA (ang. *all-trans-retinoic acid*) oraz antracyklinami [12]. Niestety u 30% chorych leczonych tradycyjnie następuje nawrót choroby, zwykle w formie odpornej na ATRA i rokowania dla tych pacjentów były do tej pory bardzo niepomyślne [13]. Stąd wyniki chińskich badaczy spotkały się z ogromnym zainteresowaniem i rozpoczęto intensywne badania nad arsenikiem w ośrodkach naukowych na całym świecie.

W drugiej połowie lat 90-tych w USA terapię arsenikową zastosowano u 52 śmiertelnie chorych pacjentów z nawrotami ostrej białaczki promielocytowej w formie odpornej na wszystkie znane leki [13, 14]. Chorem podawano codziennie kroplówkę z arsenikiem w dawce 10-15 mg lub 0,15 mg / kg masy ciała w przypadku dzieci, aż do zniknięcia komórek białaczkowych ze szpiku kostnego, średnio przez 34 dni (od 14 do 63 dni). U 87% pacjentów nastąpiła remisja choroby (45 z 52), co całkowicie potwierdziło wyniki z Chin [13, 14]. Głównymi skutkami ubocznymi terapii arsenikiem były: zwiększona leukocytoza (u 50% pacjentów), zmiany w elektrokardiogramie (wydłużenie odcinka QT; 40%), syndrom różnicowania APL (wysięki w opłucnej, duszności, gorączka, wzrost wagi ciała; 22%), hiperglikemia, wysypka, bóle głowy, nudności, wymioty [14, 15]. Po 18 miesiącach od zakończenia terapii 27 pacjentów z 40 pozostało przy życiu (68%), a u 23 osób (58%) nie nastąpił nawrót choroby [15]. Na podstawie tych wyników arsenik jako Trisenox™ został zaaprobowany w USA do leczenia nawrotów APL w formie odpornej na ATRA we wrześniu 2000 roku [15].

III. Rola receptora kwasu retinowego oraz białka PML w patogenezie ostrej białaczki promielocytowej

Ostra białaczka promielocytowa charakteryzuje się nadmierną akumulacją w szpiku kostnym prekursorów komórek mieloidalnych zatrzymanych w różnicowaniu się na etapie komórek promielocytowych, co prowadzi do ciężkiej niedokrwistości i objawów skazy krwotocznej (Ryc. 1) [16]. W 95% przypadków ostrej białaczki promielocytowej obserwuje się



Ryc. 1. Schemat powstawania ostrej białaczki promielocytowej oraz efekty terapeutyczne kwasu retinojowego i arseniku. Dojrzwianie i różnicowanie granulocytów odbywa się w szpiku i obejmuje wiele etapów pośrednich. Na skutek translokacji chromosomowej t(15;17), w wyniku której dochodzi do fuzji genów kodujących receptor kwasu retinojowego RAR α i białko białaczki promielocytowej PML, promielocyty nie różnicują się do mielocytów i zaczynają się niekontrolowanie dzielić. Lecznicze dawki kwasu retinojowego powodują różnicowanie się komórek białaczkowych do mielocytów. Natomiast arsenik w zależności od zastosowanego stężenia może indukować częściowe różnicowanie komórek białaczkowych lub ich śmierć.

dominującą mutację w postaci translokacji chromosomowej t(15;17), w wyniku której dochodzi do fuzji genu PML (ang. *promyelocytic leukemia*) leżącego na chromosomie 15 z genem RAR α (ang. *retinoic acid receptor α*) z chromosomu 17 i powstania chimerycznego białka PML-RAR α lub RAR α -PML [17, 18].

III-1. Mechanizm regulacji transkrypcji genów odpowiedzialnych za różnicowanie komórek mieloidalnych przez receptor kwasu retinojowego

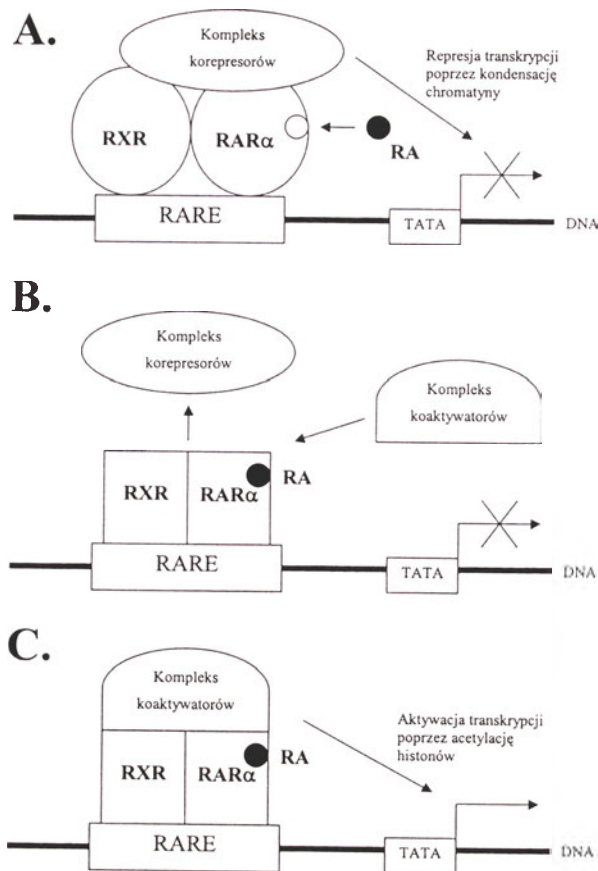
Produkt białkowy genu RAR α należy do nadrodziny jądrowych receptorów hormonalnych będących regulatorami transkrypcji genów [16]. Receptor RAR α modulowany jest przez retinoidy (witamina A), które nie tylko zapewniają prawidłowe widzenie, ale także są ważnymi regulatorami podziałów komórkowych i procesów różnicowania [19].

Receptor kwasu retinojowego RAR α jako heterodimer z receptorem RXR (ang. *retinoid X receptor*) przyłącza się do specyficznej sekwencji DNA – elementu odpowiedzi na kwas retinojowy RARE (ang. *retinoic acid response element*) i tworzy jednostkę transkrypcyjną indukowaną przez ligand w postaci kwasu retinojowego [16] (Ryc. 2). Przy nieobecności kwasu retinojowego heterodimer RAR α -RXR połączony jest z kompleksem korepresorowym, w

skład którego wchodzi białko N-CoR lub SMRT, mSin3 oraz deacetylaza histonowa HDAC [20, 21, 22]. Obecność korepresora powoduje kondensację chromatyny w obszarze promotorowym regulowanego genu poprzez deacetylację histonów, co jest przyczyną niemożności przyłączenia się w tym miejscu DNA kompleksu inicjującego transkrypcję (Ryc. 2). Związanie kwasu retinojowego z domeną wiązania liganda LBD (ang. *ligand binding domain*) receptora RAR α pozwala na oddysocjowanie kompleksu korepresorów i przyłączenie się w jego miejsce koaktywatorów transkrypcji, m.in. acetylotransferaz histonowych [23] (Ryc. 2).

W przypadku ostrej białaczki promielocytowej białko PML-RAR α jako homodimer przyłączone jest również do sekwencji RARE w promotorach regulowanych genów, ale na stałe związane jest z kompleksem korepresorów, gdyż nie reaguje na fizjologiczne stężenia kwasu retinojowego w komórce. W rezultacie transkrypcja genów regulujących podziały i różnicowanie promielocytów ulega ciągłej represji [16].

Główną rolą biologiczną receptora RAR α jest prawdopodobnie regulacja procesu różnicowania komórek mieloidalnych [24]. Wiadomo od dawna, że niedobór witaminy A powoduje zaburzenia hematopoezy, a kwas retinojowy indukuje ekspresję genu RAR α głównie w komórkach mieloidalnych [25, 26]. Ponadto nadekspresja RAR α powoduje zablokowanie różnicowania komórek mieloidalnych na etapie pro-



Ryc. 2. Regulacja transkrypcji genów przez kwas retinowy. (A) W promotorach genów regulowanych przez kwas retinowy (RA) znajduje się specyficzna sekwencja DNA — element odpowiedzi na kwas retinowy (RARE), która jest miejscem przyłączenia heterodimeru złożonego z receptora kwasu retinowego (RAR α) i receptora retinoidu X (RXR). Przy nieobecności RA z heterodimerem RAR α -RXR połączony jest kompleks korepresorów. W skład kompleksu wchodzi m.in. deacetylaza histonowa HDAC, której aktywność prowadzi do kondensacji chromatyny i represji transkrypcji. (B) Przyłączenie kwasu retinowego (RA) do receptora RAR α powoduje zmianę konformacji dimeru RAR α -RXR i w konsekwencji odłączenie kompleksu korepresorów. (C) Do dimeru RAR α -RXR może teraz przyłączyć się kompleks koaktywatorów wraz z acetylazą histonową. Dzięki acetylacji histonów następuje rozluźnienie struktury chromatyny i do promotora genu może się przyłączyć kompleks transkrypcyjny.

mielocytów [27]. Białko RAR α reguluje prawdopodobnie ekspresję genów kodujących inne czynniki transkrypcyjne (np. Hox, STAT, C/EBP), a także regulatory cyklu komórkowego oraz apoptozy [24].

III-2. Mutacja w genie kodującym białko białaczki promielocytowej PML prowadzi do zaburzenia regulacji cyklu komórkowego i apoptozy

Podczas gdy rolę retinoidów i ich receptorów w procesach różnicowania częściowo wyjaśniono, to funkcja biologiczna białka PML była do niedawna słabo poznana, ale wiele danych wskazuje na jego udział w regulacji transkrypcji genów związanych z apoptozą i procesami starzenia się komórki, a chimera PML-RAR α blokuje te funkcje w przypadku ostrej białaczki promielocytowej.

W zdrowych komórkach białko PML znajduje się w specyficznych jądrowych strukturach zwanych onkogennymi domenami PML — POD (ang. *PML oncogenic domain*) lub ciałkami jądrowymi — NB

(ang. *nuclear body*) [28, 29], do których białko PML jest kierowane po kowalencyjnym związaniu z małym, podobnym do ubikwityny polipeptydem SUMO-1 [30]. Natomiast w komórkach białaczki promielocytowej zaobserwowano, że ciałka jądrowe NB są rozbite na wiele mikrostruktur zawierających normalne i zmutowane białka PML [28, 29]. Ostatnio pokazano, że komórki z usuniętymi obiema kopiami genu PML wykazują również dezorganizację struktur NB [31]. Ponadto do prawidłowego wytworzenia ciałek jądrowych NB wymagana jest modyfikacja białka PML przez SUMO-1 [31]. Białko PML występuje w ciałkach jądrowych NB razem z ponad dwudziestoma białkami, takimi jak regulatory transkrypcji (CBP, RFP), supresory nowotworowe (Rb, p53), białka związane z apoptozą i cyklem komórkowym (Daxx, BAX, cyklina D3, KIP1/p27), a także białka towarzyszące infekcjom wirusowym (Sp100) [32, 33]. Postawiono hipotezę, że struktury NB są miejscami aktywnej transkrypcji albo obszarami gdzie aktywność różnych czynników transkrypcyj-

nych jest regulowana w sposób zintegrowany [33]. Białko PML zawiera domenę palca cynkowego typu RING bogatą w reszty cysteiny i histydyny (motyw C3HC4), która jest charakterystyczna dla wielu białek biorących udział w regulacji ekspresji genów, onkogenezie, rekombinacji i naprawie DNA [32, 33]. Jakkolwiek białko PML samo nie przyłącza się do DNA, to wchodzi w interakcje z koaktywatorami i korepresorami transkrypcji [32, 33].

W ciałkach jądrowych NB białko PML występuje często razem z koaktywatorem transkrypcji acetylotransferazą CBP [34]. Wykazano, że białko PML nie tylko wzmacnia aktywność acetylotransferazy CBP, ale także samo funkcjonuje jako koaktywator dla innych czynników transkrypcyjnych, takich jak receptory jądrowe i czynnik transkrypcyjny AP-1 [34, 35]. Ostatnio wyjaśniono mechanizm aktywacji transkrypcji genów przez białko PML na przykładzie regulacji aktywności białka p53 [36, 37]. Supresor nowotworowy p53 indukuje proces starzenia się komórki w odpowiedzi na sygnały onkogenne [37]. Okazało się, że PML wchodzi w bezpośrednie interakcje z p53 i oba białka lokalizują się w strukturach NB [36]. Ponadto w komórkach PML^{-/-} nie zaobserwowano zależnej od p53 apoptozy indukowanej przez uszkodzenia DNA, a także stwierdzono brak aktywności transkrypcyjnej białka p53 [36]. Białko p53 jest transkrypcyjnie aktywne po acetylacji przez acetylotransferazę CBP/p300 [33]. Postawiono hipotezę, że białko PML może stabilizować kompleks p53-CBP [33]. Pearson i współpracownicy [37] wykazali, że białko onkogenne Ras indukuje ekspresję genu PML oraz powoduje przemieszczenie białek p53 i CBP do ciałek jądrowych NB, w obrębie których powstaje kompleks p53-PML-CBP. Jednocześnie takie zjawiska jak: indukowana przez Ras acetylacja p53, stabilizacja kompleksu p53-CBP i proces starzenia się komórki, nie występują w fibroblastach PML^{-/-} [37].

Białko PML indukuje ponadto ekspresję genów kompleksu MHC (ang. *major histocompatibility complex*), które odpowiedzialne są za prezentację obcych antygenów na powierzchni komórek w celu wywołania odpowiedzi immunologicznej [38]. W przypadku ostrej białaczki promielocytowej chimera PML-RAR α obniża transkrypcję genów MHC, co powoduje nie rozpoznawanie komórek zmutowanych jako nowotworowe przez układ odpornościowy organizmu [38].

Jedną z wielu funkcji białka PML jest represja transkrypcji. Acetylacja reszt lizyny w histonach neutralizuje ładunek dodatni białka i prawdopodobnie wpływa na interakcje histonów i DNA, co pozwa-

ła na przyłączenie się czynników transkrypcyjnych do promotora określonego genu [39]. Okazuje się, że białko PML bezpośrednio łączy się deacetylazą histonową HDAC i ta interakcja jest niezbędna do represji genów przez supresory nowotworowe Mad i Rb [40, 41, 42]. Chimeryczne białko PML-RAR α prawdopodobnie wiąże deacetylazę histonową HDAC w sposób uniemożliwiający interakcję HDAC z Mad i Rb, co prowadzi do aktywacji ekspresji genów warunkujących np. przejście komórki z fazy G1 do fazy S cyklu komórkowego [41, 42].

Ostatnio wykazano, że białko PML hamuje transformację nowotworową także poprzez regulację translacji [43]. Do domeny RING białka PML przyłącza się czynnik inicjujący 4E (eIF4E), który bierze udział w transporcie z jądra do cytosolu grupy transkryptów, w tym regulatora cyklu komórkowego cykliny D1. Białko PML zmienia aktywność eIF4E przez drastyczne obniżenie jego powinowactwa do substratu w postaci cząsteczek mRNA z czapeczką 7-metyloguanylanu na końcu 5', w tym mRNA cykliny D1 [43]. Tym samym białko PML obniża poziom białka cykliny D1 i hamuje transformację nowotworową.

IV. Leczenie ostrej białaczki promielocytowej kwasem retinojowym polega na aktywacji procesu różnicowania komórek nowotworowych w neutrofile

W 1980 roku Breitman i współpracownicy zaobserwowali, że kwas całkowicie — *trans*-retinojowy może indukować różnicowanie linii komórkowej HL-60, która jest podobna do promielocytowych komórek białaczkowych, ale nie posiada mutacji t(15;17) [44]. Kilka lat później chińscy naukowcy donieśli, że doustne podawanie kwasu retinojowego pacjentom chorym na ostrą białaczkę promielocytową powoduje całkowitą remisję choroby bez znaczących skutków ubocznych [45]. Wyleczenie następowało dzięki końcowemu różnicowaniu komórek białaczkowych w neutrofile, co było pierwszym przykładem tzw. terapii różnicowania, której celem nie jest zabicie komórek nowotworowych, ale ich przemiana w prawidłowe komórki [46] (Ryc. 1).

Na poziomie komórkowym kwas retinojowy powoduje zniknięcie licznych mikrostruktur zawierających chimery PML-RAR α w jądrze oraz przywraca normalne ciała jądrowe NB z białkami PML [47]. Jednocześnie kwas retinojowy przyczynia się do degradacji chimerycznych białek PML-RAR α [48] oraz aktywuje transkrypcję dzikiego genu RAR α [49]. Niestety u prawie wszystkich pacjentów

leczonych tylko kwasem retinowym następował nawrót choroby w ciągu kilku miesięcy [50]. Oporność na kwas retinowy może być spowodowana wiązaniem tego związku przez białko CRABP (ang. *cellular RA-binding protein*), zwiększonym katabolizmem kwasu retinowego przy udziale cytochromu P450 oraz usuwaniem kwasu retinowego z komórki przez transporter MDR1 [51, 52]. Ponadto zidentyfikowano wiele mutacji w domenie wiążącej ligand (LBD) chimer PML-RAR α izolowanych zarówno z linii komórkowych białaczki promielocytowej, jak i z pacjentów z opornością na kwas retinowy [53]. Większość tych mutacji powoduje, że do kompleksu PML-RAR α -korepresor nie może się w ogóle przyłączyć ligand w postaci kwasu retinowego. Z tego powodu nie dochodzi do odblokowania transkrypcji odpowiednich genów (Ryc. 2), mimo zastosowania dawek leku przewyższających wielokrotnie fizjologiczne stężenie kwasu retinowego w komórce [53].

Włączenie kwasu retinowego do standardowych chemioterapii spowodowało zwiększenie liczby wyleczeń i tylko u 20-30% pacjentów obserwuje się nawrót choroby [19]. U tych ostatnich próbuje się stosować syntetyczny retinoid Am80, witaminę K2 lub inhibitory deacetylaz histonowych, np. fenylomaślan sodu, oraz ostatnio, z najlepszym skutkiem, arsenik [16].

V. Molekularny mechanizm działania arszeniku w komórkach białaczki promielocytowej

Wraz z zastosowaniem arszeniku w leczeniu ostrej białaczki promielocytowej rozpoczęto badania nad wpływem arszeniku na linie komórek nowotworowych białaczki promielocytowej. Stwierdzono, że arsenik w niskich stężeniach powoduje częściowe różnicowanie się komórek nowotworowych (Ryc. 1), a stosunkowo wysokie stężenia tego związku indukują apoptozę [54, 55] (Ryc. 3).

V-1. Częściowe różnicowanie się komórek białaczkowych indukowane przez arsenik spowodowane jest degradacją chimerycznych białek złożonych z receptora kwasu retinowego i białka białaczki promielocytowej

Komórki białaczkowe izolowane od pacjentów chorych na ostrą białaczkę promielocytową posiadają na swej powierzchni antygen CD33 charakterystyczny dla niedojrzałych komórek mieloidalnych [6]. Zaobserwowano, że w toku terapii arsenikowej

wśród komórek białaczkowych izolowanych od pacjentów pojawiają się komórki z antygenem powierzchniowym CD11b typowym dla dojrzałych mielocytów, co by wskazywało na indukcję procesu różnicowania [13]. Jednakże komórki CD11b były tylko podobne do mielocytów i nie odpowiadały końcowemu stadium różnicowania — granulocytom, co można osiągnąć w terapii kwasem retinowym [13, 54] (Ryc. 1). Badania z użyciem hodowli komórkowych pokazały, że proces częściowego różnicowania komórek białaczki promielocytowej ma miejsce przy zastosowaniu niskich dawek arszeniku w stężeniach 0,1-0,5 μ M [54]. Molekularny mechanizm tego zjawiska polega prawdopodobnie na bezpośrednim oddziaływaniu arszeniku na białka PML i PML-RAR α , ponieważ arsenik indukuje ich transport do ciałek jądrowych NB, gdzie ulegają degradacji [56]. Jak już wspomniano wcześniej, białko PML kierowane jest do ciałek jądrowych NB po związaniu z polipeptydem SUMO-1, a proces ten w przypadku zarówno białka PML jak i chimery PML-RAR α indukowany jest właśnie przez arsenik i związki pokrewnego metaloidu antymonu [57]. Ostatnio pokazano, że arsenin hamuje interakcje korepresora SMRT z czynnikami transkrypcyjnymi, w tym z PML-RAR α [58]. Arsenin poprzez aktywację kaskady kinazy MAP (ang. *mitogen-activated protein*) powoduje fosforylację korepresora SMRT, w wyniku czego dochodzi do odłączenia SMRT od receptorów jądrowych RAR α i usunięcia go z jądra do cytoplazmy [58]. Zatem arsenin może odblokowywać ekspresję genów regulowanych przez receptor kwasu retinowego RAR α i indukować w ten sposób różnicowanie komórek nowotworowych białaczki promielocytowej.

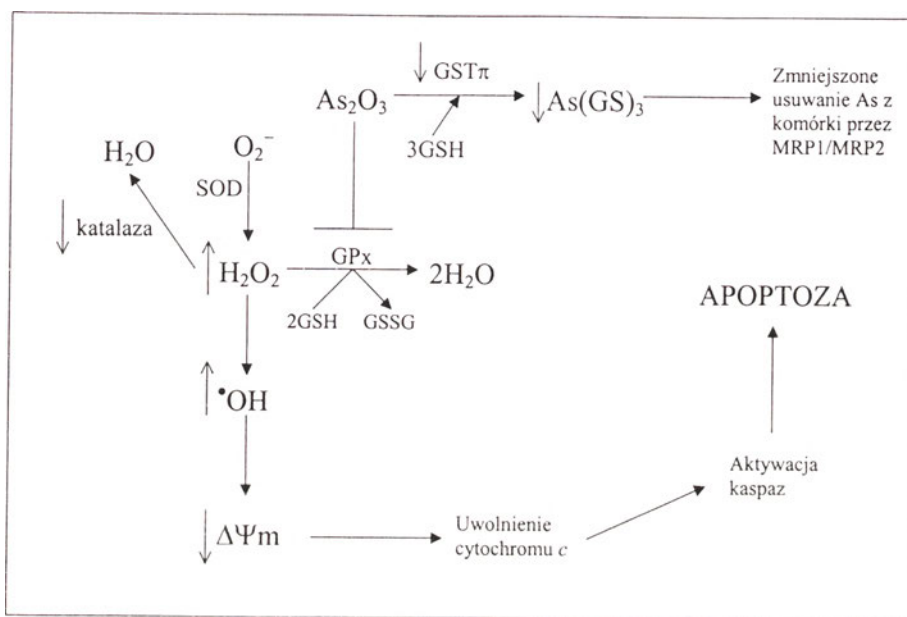
V-2. Arsenik indukuje apoptozę poprzez zwiększenie ilości nadtlenu wodoru w komórkach białaczkowych

Badając molekularny mechanizm działania arszeniku w leczeniu ostrej białaczki promielocytowej stwierdzono, że arsenik w relatywnie wysokich stężeniach 0,5-2,0 μ M indukuje apoptozę w komórkach białaczkowych linii NB4 z translokacją t(15; 17) [54, 55]. Szybko okazało się, że zjawisko to nie zależy od obecności chimery PML-RAR α , gdyż apoptozę indukowaną przez arsenik zaobserwowano w wielu liniach komórek białaczkowych z różnymi mutacjami [59]. Apoptoza indukowana przez arsenik w komórkach linii NB4 nie jest związana z aktywacją znanych białek apoptogennych, takich jak Bax, c-myc czy p53, lecz raczej z obniżeniem poziomu białka Bcl-2, które jest znanym inhibitorem apoptozy [54,

59, 60]. Jednakże tego zjawiska nie zaobserwowali inni badacze ani w komórkach NB4 ani w innych typach komórek nowotworowych [61, 62]. Jaki jest więc mechanizm indukowania apoptozy przez arsenik i dlaczego dochodzi tylko do śmierci komórek białaczkowych?

Główną rolę w tolerancji komórek ssaków na związki arsenu trójwartościowego pełni zredukowany glutation (GSH) [63, 64]. GSH jest głównym „zmiataczem” wolnych rodników w komórce oraz pełni ważną rolę w detoksykacji licznych ksenobio-

rowe wątroby i płuc, które charakteryzowały się najwyższą zawartością GSH, tolerowały relatywnie wysokie stężenia arsenu [67]. Ponadto związki zmniejszające w komórce poziom GSH, takie jak butioninosulfoksymina (BSO, inhibitor syntetazy γ -glutamylcysteinowej enzymu szlaku biosyntezy GSH) czy kwas askorbinowy, który poprzez autooksydację generuje H_2O_2 , wspomagają arsenik w indukcji apoptozy [67, 68]. Jednocześnie w obecności katalazy, enzymu rozkładającego H_2O_2 , nie zaobserwowano wzmocnienia apoptozy indukowanej przez



Ryc. 3. Mechanizm indukacji apoptozy przez arsenik w komórkach białaczki promielocytowej. Produktem ubocznym tlenowego metabolizmu komórki są rodniki ponadtlenkowe, które są przekształcane w nadtlenek wodoru przy udziale dysmutazy ponadtlenkowej (SOD). Nadtlenek wodoru z kolei rozkładany jest do wody przez katalazę i peroksydazę glutationową (GPx). W komórkach białaczki promielocytowej po zadziałaniu arsenikiem obserwuje się wzrost stężenia nadtlenku wodoru spowodowany prawdopodobnie bezpośrednim hamowaniem peroksydazy glutationowej przez jony arsenu. Na zwiększenie ilości nadtlenku wodoru w komórkach białaczki promielocytowej ma wpływ również obniżona aktywność katalazy. Nagromadzony nadtlenek wodoru łatwo ulega przekształceniu w rodniki hydroksylowe, które przez obniżenie potencjału transbłonowego mitochondrium $\Delta\Psi_m$ uruchamiają kaskadę zjawisk prowadzących do apoptozy. Indukcję apoptozy w komórkach białaczki promielocytowej można uzyskać używając stosunkowo niskie stężenia arsenu, ponieważ komórki te charakteryzują się zmniejszonym usuwaniem arsenu z komórki przez białka MRP1 i MRP2. Substratem dla tych transporterów mogą być tylko koniugaty arsenu z glutationem $As(GS)_3$. Reakcja koniugacji arsenu z glutationem (GSH) katalizowana jest przez S-transferazę glutationową (GST- π), której aktywność jest znacznie obniżona w komórkach białaczki promielocytowej. W efekcie zwiększa się ilość wolnych jonów arsenu hamujących peroksydazę glutationową.

tyków [65, 66]. Zwiększona ekspresja S-transferazy glutationowej (GST- π) oraz GSH obserwowana jest w liniach komórkowych opornych na arsenik [67]. Okazało się, że komórki białaczki promielocytowej, które są najbardziej wrażliwe na arsenik, mają bardzo niski poziom GSH [68]. W przypadku innych typów komórek białaczkowych oraz guzów litych obserwowano spadek wrażliwości na arsenik wraz ze wzrostem wewnątrzkomórkowego stężenia GSH [67, 68]. Z siedemnastu linii komórek nowotworowych zbadanych przez Y a n g a i współpr. [67] komórki nowotworowe żołądka i jelit, pęcherza oraz komórki białaczki promielocytowej były najbardziej wrażliwe na działanie arsenu. Komórki nowotwo-

arsenik, co wskazywałoby na rolę reaktywnych form tlenu (RFT) w tym procesie [68].

Jeden z ostatnio poznanych mechanizmów indukacji apoptozy, opisanych szczegółowo na łamach *Postępów Biochemii* [69], obejmuje wzrost ilości reaktywnych form tlenu, które powodują w kolejności spadek potencjału transbłonowego mitochondrium ($\Delta\Psi_m$), zwiększenie przepuszczalności błony mitochondrialnej, w wyniku czego dochodzi do uwolnienia do cytoplazmy cytochromu c, aktywacji kaspaz (proteazy specyficzne dla reszty asparaginianowej), a dalej do inaktywacji wielu białek, m.in. polimerazy poli(ADP-rybozy) (PARP) współdziałającej w naprawie i utrzymaniu stabilności DNA (Ryc. 3). Udo-

wodniono, że wiele różnych czynników takich jak ceramidy, cytokina TNF- α , promieniowanie UV i antracyklina indukują apoptozę poprzez generowanie RFT [61].

Ostatnio wykazano, że indukcja apoptozy przez arsenik w komórkach białaczki promielocytowej zależy od enzymów regulujących poziom H_2O_2 [61] (Ryc. 3). Nadtlenek wodoru rozkładany jest przez katalazę w cytoplazmie oraz przez peroksydazę glutationową (GPx) działającą w cytoplazmie i mitochondriach [65, 66]. Redukcji H_2O_2 przez peroksydazę glutationową towarzyszy utlenienie glutationu do disulfidu glutationu (GSSG), który następnie zostaje zredukowany z powrotem do glutationu przy udziale reduktazy glutationowej i NADPH [65, 66] (Ryc. 3). Arsenik powoduje wzrost stężenia H_2O_2 w komórkach białaczki promielocytowej, a także hamuje aktywność peroksydazy glutationowej [61]. Wczesniejsze potraktowanie komórek seleninem, aktywatorem peroksydazy glutationowej, hamuje zarówno wzrost poziomu H_2O_2 , jak i sam proces apoptozy indukowany przez arsenik [61]. Z drugiej strony, inhibitory katalazy i peroksydazy glutationowej sprzyjają apoptozie w komórkach białaczki promielocytowej [61]. Główną drogą detoksykacji związków arsenu trójwartościowego u ssaków jest aktywny transport S-koniugatów glutationu i arsenu na zewnątrz komórki [63, 64, 70]. Tworzenie koniugatów glutationu wymaga obecności S-transferazy glutationowej (GST- π), której poziom jest także znacznie obniżony w komórkach białaczki promielocytowej [61]. Na podstawie powyższych danych postawiono hipotezę, że wzrost poziomu H_2O_2 w komórkach białaczki promielocytowej spowodowany jest bezpośrednim hamowaniem peroksydazy glutationowej

przez wolne jony As^{3+} , których ilość jest stosunkowo większa z powodu niskiej aktywności S-transferazy glutationowej [61]. Arsenik może zwiększać też produkcję H_2O_2 poprzez aktywację oksydazy NADPH w mitochondriach [71]. Nagromadzony H_2O_2 łatwo ulega przekształceniu w rodniki hydroksylowe, które powodują spadek potencjału transbłonowego mitochondrium $\Delta\Psi_m$ i zwiększają przepuszczalność błony mitochondrialnej, co prowadzi w kolejności do uwolnienia cytochromu *c* do cytosolu, aktywacji kaspaz, degradacji białek oraz DNA i w końcu do śmierci komórki (Ryc. 3). Powyższe zjawiska obserwowano wielokrotnie podczas indukcji apoptozy przez arsenik w wielu rodzajach komórek nowotworowych [61, 71-73].

VI. Arsenik hamuje wzrost różnych typów komórek nowotworowych

Doniesienia o dużej skuteczności arsenu w leczeniu ostrej białaczki promielocytowej skłoniły wielu badaczy do sprawdzenia czy związek ten będzie indukował apoptozę także w innych typach komórek nowotworowych. W ramach badań przedklinicznych zbadano wpływ arsenu na kilkadziesiąt linii komórek nowotworowych i w większości przypadków zaobserwowano redukcję wzrostu i apoptozę komórek po zadziałaniu arsenu w stężeniach bezpiecznych dla zdrowia człowieka (Tab. 1). Ponadto stwierdzono, że arsenik hamuje angiogenezę w guzach litych u myszy [80]. Już po pierwszej iniekcji arsenu do guza obserwowano zanik naczyń krwionośnych i nekrozę guza bez uszkodzenia sąsiednich zdrowych tkanek [80]. Na podstawie tych wyników rozpoczęto w 2000 roku kilkanaście badań

Tabela 1

Przykłady komórek nowotworowych, które ulegają apoptozie pod wpływem arsenu.

Typ nowotworu	Nazwa linii komórkowej	Literatura
Ostra białaczka mieloblastyczna	HL-60	[59, 74]
Ostra białaczka monoblastyczna	U937	[59]
Przewlekła białaczka szpikowa	U266	[75]
Chłoniaki	Su-DHL-4	[67]
Rak żołądka	AGS, MKN-28, MGC-803	[72, 76]
Rak jelita grubego	SW620	[68]
Rak szyjki macicy	TSGH8302	[68]
Rak jajnika	MDAH-2774	[77, 78]
Rak gruczołu krokowego	DU-145, PC-3	[77, 79]
Rak dróg moczowych	NTU-81	[68]
Rak mózgu	NB16, NB19	[62]

klinicznych nad skutecznością arseniku w leczeniu ostrych białaczek mieloblastycznych i limfoblastycznych, przewlekłych białaczek szpikowych, choroby Hodgkina, chłoniaków nieziarniczych, a także w leczeniu guzów litych gruczołu krokowego, szyjki macicy, nerek i pęcherza moczowego [81]. Arsenik jest związkiem tanim, powszechnie dostępnym, powodującym słabe skutki uboczne i zastosowanie go w leczeniu wielu typów nowotworów mogłoby nie tylko zwiększyć skuteczność, ale także obniżyć koszty chemioterapii nowotworów.

Podziękowania

Robert Wysocki dziękuje Fundacji na Rzecz Nauki Polskiej za wsparcie finansowe w ramach krajowego stypendium dla młodych naukowców.

Artykuł otrzymano 3 stycznia 2002
Zaakceptowano do druku 14 lutego 2002

Piśmiennictwo

- Weider B, Fournier JH (1999) *Am J Forensic Met Pathol* **20**: 378-382
- Abernathy CO, Liu YP, Longfellow D, Apshian HV, Beck B, Fowler B, Goyer R, Menzer R, Rossman T, Thompson C, Waalkes M (1999) *Environ Health Perspect* **107**: 593-597
- Liu SX, Athar M, Lippai I, Waldren C, Hei TK (2001) *Proc Natl Acad Sci USA* **98**: 1643-1648
- Rossman TG, Uddin AN, Burns FJ, Bosland MC (2001) *Toxicol Appl Pharmacol* **176**: 64-71
- Antman KH (2001) *Oncologist* **6**(suppl 2): 1-2
- Waxman S, Anderson KC (2001) *Oncologist* **6**(suppl 2): 3-10
- Forkner CE, Scott TFM (1931) *JAMA* **97**: 3-5
- Barrett SV, Barrett MP (2000) *Parasitol Today* **16**: 7-9
- Mervis J (1996) *Science* **273**: 578
- Sun HD, Ma L, Hu XC, Zhang TD (1992) *Chin J Integrat Chin and West Med* **12**: 170-172
- Zhang P, Wang SY, Hu XH (1996) *Chin J Hematol* **17**: 58-62
- Shen ZX i 19 współpr. (1997) *Blood* **89**: 3354-3360.
- Soignet SL i 11 współpr. (1998) *N Engl J Med* **339**:1341-1348
- Rust MR, Soignet SL (2000) *Oncologist* **6** (suppl 2): 29-32
- Cohen MH, Hirschfeld S, Flamm Honig S, Ibrahim A, Johnson JR, O'Leary JJ, White RM, Williams GA, Pazdur R (2001) *Oncologist* **6**: 4-11
- Lin RJ, Egan DA, Evans RM (1999) *Trends Genet* **15**: 179-184
- de The H, Chomienne C, Lanotte M, Degos L, Dejean A (1990) *Nature* **347**: 558-561
- Borrow J, Goddard AD, Sheer D, Solomon E (1990) *Science* **249**: 1577-1580
- Soignet SL (2001) *Oncologist* **6**(suppl 2): 11-16
- Nagy L, Kao HY, Chakravarti D, Lin RJ, Hassig CA, Ayer DE, Schreiber SL, Evans RM (1997) *Cell* **89**: 373-380
- Heinzel T i 14 współpr. (1997) *Nature* **387**: 43-48
- Alland L, Muhle R, Hou H Jr, Potes J, Chin L, Schreiber-Agus N, DePinho RA (1997) *Nature* **387**: 49-55
- Bannister AJ, Kouzarides T (1996) *Nature* **384**: 641-643
- Melnick A., Licht JD (1999) *Blood* **93**: 3167-3215
- Hodges RE, Sauberlich HE, Canham JE, Wallace DL, Rucker RB, Mejia LA, Monhanram M (1978) *Am J Clin Nutr* **31**: 876-885
- De The H, Marchio A, Tiollais P, Dejean A (1989) *EMBO J* **8**: 429-433
- Tsai S, Collins SJ (1993) *Proc Natl Acad Sci USA* **90**: 7153-7157
- Dyck JA, Maul GG, Miller WH Jr, Chen JD, Kakizuka A, Evans RM (1994) *Cell* **76**: 333-343
- Weis K, Rambaud S, Lavau C, Jansen J, Carvalho T, Carmo-Fonseca M, Lamond A, Dejean A (1994) *Cell* **76**: 345-356
- Muller S, Matunis MJ, Dejean A (1998) *EMBO J* **17**: 61-70
- Zhong S, Muller S, Ronchetti S, Freemont PS, Dejean A, Pandolfi PP (2000) *Blood* **95**: 2748-2752
- Melnick A, Licht JD (1999) *Blood* **93**: 3167-3215
- Costoya JA, Pandolfi PP (2001) *Curr Opin Hematol* **8**: 212-217
- Doucas V, Tini M, Egan DA, Evans RM (1999) *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 2627-2632
- Vallian S, Gaken JA, Gingold EB, Kouzarides T, Chang KS, Farzaneh F (1998) *Oncogene* **16**: 2843-2853
- Guo A, Salomoni P, Luo J, Shih A, Zhong S, Gu W, Pandolfi PP (2000) *Nat Cell Biol* **2**: 730-736
- Pearson M, Carbone R, Sebastiani C, Cioce M, Fagioli M, Saito S, Hagashimoto Y, Appella E, Minucci S, Pandolfi PP, Pelicci PG (2000) *Nature* **406**: 207-210
- Zheng P, Guo Y, Niu Q, Levy DE, Dyck JA, Lu S, Sheiman LA, Liu Y (1998) *Nature* **396**: 373-376
- Vettese-Dadey M, Grant PA, Hebbes TR, Crane C, Allis CD, Workman JL (1996) *EMBO J* **15**: 2508-2518
- Wu WS, Vallian S, Seto E, Yang WM, Edmondson D, Roth S, Chang KS (2001) *Mol Cell Biol* **21**: 2259-2268
- Khan MM, Nomura T, Kim H, Kaul SC, Wadhwa R, Shinagawa T, Ichikawa-Iwata E, Zhong S, Pandolfi PP, Ishii S (2001) *Mol Cell* **7**: 1233-1243
- Khan MM, Nomura T, Kim H, Kaul SC, Wadhwa R, Zhong S, Pandolfi PP, Ishii S (2001) *J Biol Chem* **276**: 43491-43494
- Cohen N, Sharma M, Kentsis A, Perez JM, Strudwick S, Borden KL (2001) *EMBO J* **20**: 4547-4559
- Breitman TR, Selonick SE, Collins SJ (1980) *Proc Natl Acad Sci USA* **77**: 2936-2940
- Huang ME, Ye YC, Chen SR, Chai JR, Lu JX, Zhao L, Gu LJ, Wang ZY (1988) *Blood* **72**: 567-572
- Warrell RP Jr, Frankel SR, Miller WH Jr i współpr. (1991) *New Engl J Med* **324**: 1385-1393
- Koken MHM, Puvion-Dutilleul F, Guillemin MC i współpr. (1994) *EMBO J* **13**: 1073-1083
- Raelson JV, Nervi C, Rosenauer A, Benedetti L, Monczak Y, Pearson M, Pelicci PG, Miller WH Jr (1996) *Blood* **88**: 2826-2832
- Chomienne C, Balitrand N, Ballerini P, Castaigne S, de The H, Degos L (1991) *J Clin Invest* **88**: 2150-2154
- Frankel SR, Eardley A, Heller G, Berman E, Miller WH Jr, Dmitrovsky E, Warrell RP Jr (1994) *Ann Intern Med* **120**: 278-286
- Delva L, Cornic M, Balitrand N (1993) *Blood* **82**: 2175-2181
- Kizaki M, Ueno H, Yamazoe Y, Shimada M, Takayama N, Muto A, Matsushita H, Nakajima H, Morikawa M, Koeffler HP, Ikeda Y (1996) *Blood* **87**: 725-733
- Cote S, Zhou D, Bianchini A, Nervi C, Gallagher RE, Miller WH Jr. (2000) *Blood* **96**: 3200-3208
- Chen GQ i 24 współpr. (1997) *Blood* **89**: 3345-3353
- Chen GQ i 19 współpr. (1996) *Blood* **88**: 1052-1061

56. Zhu J, Koken MH, Quignon F, Chelbi-Alix MK, Dęgos L, Wang ZY, Chen Z, de The H (1997) *Proc Natl Acad Sci USA* **94**: 3978-3983
57. Muller S, Miller WH, Dejean A (1998) *Blood* **92**: 4308-4316
58. Hong SH, Yang Z, Privalsky ML (2001) *Mol Cell Biol* **21**: 7172-7182
59. Wang ZG, Rivi R, Delva L, Konig A, Scheinberg DA, Gambacorti-Passerini C, Gabrilove JL, Warrell Jr RP, Pandolfi PP (1998) *Blood* **92**: 1497-1504.
60. Huang C, Ma W, Li J, Dong Z (1999) *Cancer Res* **59**: 3053-3058
61. Jing Y, Dai J, Chalmers-Redman RME, Tatton WG, Waxman S (1999) *Blood* **94**: 2102-2111
62. Akao Y, Nakagawa Y, Akiyama K (1999) *FEBS Lett* **455**: 59-62
63. Wysocki R, Bobrowicz P, Ułaszewski S (1999) *Post Biochem* **45**: 304-312
64. Tamas MJ, Wysocki R (2001) *Curr Genet* **40**: 2-12
65. Bartosz G (1993) *Post Biochem* **39**: 32-38
66. Winiarska K (2000) *Post Biochem* **46**: 318-326
67. Dai J, Weinberg RS, Waxman S, Jing Y (1999) *Blood* **93**: 268-277
68. Yang CH, Kuo ML, Chen JC, Chen YC (1999) *Br J Cancer* **81**: 796-799
69. Grądzka I (2000) *Post Biochem* **46**: 2-16
70. Liu J, Chen H, Miller DS, Saavedra JE, Keefer LK, Johnson DR, Klaassen CD, Waalkes MP (2001) *Mol Pharmacol* **60**: 302-309
71. Chen YC, Lin-Shiau SY, Lin YK (1998) *J Cell Physiol* **177**: 324-333
72. Jiang XH, Chun-Yu Wong B, Yuen ST, Jiang SH, Cho CH, Lai KC, Lin MC, Kung HF, Lam SK (2001) *Int J Cancer* **91**: 173-179
73. Seol JG, Park WH, Kim ES, Jung CW, Hyun JM, Lee YY, Kim BK (2001) *Int J Oncol* **18**: 249-255
74. Perkins C, Kim CN, Fang G, Bhalla KN (2000) *Blood* **95**: 1014-1022
75. Rousselot P, Labaume S, Marolleau JP, Larghero J, Noguera MH, Brouet JC, Fermand JP (1999) *Cancer Res* **59**: 1041-1048
76. Zhang TC, Cao EH, Li JF, Ma W, Qin JF (1999) *Eur J Cancer* **35**: 1258-1263
77. Uslu R, Sanli UA, Sezgin C, Karabulut B, Terzioglu E, Omay SB, Goker E (2000) *Clin Cancer Res* **6**: 4957-4964
78. Du YH, Ho PC (2001) *Cancer Chemother Pharmacol* **47**: 481-490
79. Maeda H, Hori S, Nishitoh, Ichijo H, Ogawa O, Kakehi Y, Kakizuka A (2001) *Cancer Res* **61**: 5434-5440
80. Lew YS, Brown SL, Griffin RJ, Song CW, Kim JH (1999) *Cancer Res* **59**: 6033-6037
81. Murgó AJ (2001) *Oncologist* **6** (suppl 2): 22-28

Rola jądrowych białek wiążących się z 7-metyloguanozyną na końcu 5' RNA

The role of nuclear proteins that bind to 7-methylguanosine at the 5' end of RNA

MACIEJ KMIĘCIAK¹, ARTUR JARMOŁOWSKI²

Spis treści:

- I. Synteza kapu
- II. Rola kapu
- III. Charakterystyka jądrowych białek wiążących się do kapu
- IV. Rola CBC w splicingu pre-mRNA
- V. Identyfikacja eksonów w pre-mRNA (ang. *exon definition model*). Rola CBC w identyfikacji pierwszego eksonu
- VI. Eksport U snRNA
- VII. Eksport mRNA
- VIII. Import CBC do jądra komórkowego
- IX. Rola CBC w poliadenylacji końca 3' pre-mRNA

Contents:

- I. The cap synthesis
- II. The role of the cap
- III. Characterization of nuclear proteins that bind to the cap
- IV. The role of CBC in pre-mRNA splicing
- V. The exon definition model. The role of CBC in definition of the first exon
- VI. U snRNA export
- VII. mRNA export
- VIII. Import of CBC to the nucleus
- IX. The role of CBC in pre-mRNA polyadenylation

Wykaz stosowanych skrótów: ApppG — adenozylo 5'-5' trifosfoguanozyna; CBC — kompleks białek wiążących się z kapem (ang. *cap binding complex*); CBP — białko wiążące się z kapem (ang. *cap binding protein*); CPSF — czynnik specyficznie rozcinający i poliadenylujący; CstF, CF — czynniki stymulujące rozcinanie RNA w procesie poliadenylacji; et⁷GpppG — 7-etyloguanozylo 5'-5' trifosfoguanozyna; GAP1 — białko aktywujące GTP-azę Ran; GpppG — guanozylo 5'-5' trifosfoguanozyna; GTP — guanozynotrifosforan; kb — tysiąc par zasad; kDa — kilodalton; m⁷G — 7-metyloguanozylo; m^{2,2,7}GpppG — 2,2,7-trimetyloguanozylo 5'-5' trifosfoguanozyna; m^{2,7}GpppG — 2,7-dimetyloguanozylo 5'-5' trifosfoguanozyna; m⁷GpppG — 7-metyloguanozylo 5'-5' trifosfoguanozyna; NLS — sygnał lokalizacji jądrowej; NPC — por jądrowy; poliA — ogon poliadenylowy; Ran — GTP-aza; RCC1 — ang. *guanine nucleotide exchange factor*; SDS — dodecylosiarczan sodu; SDS-PAGE — elektroforeza w żelu poliakrylamidowym z SDS; snRNA — jądrowy niskocząsteczkowy RNA.

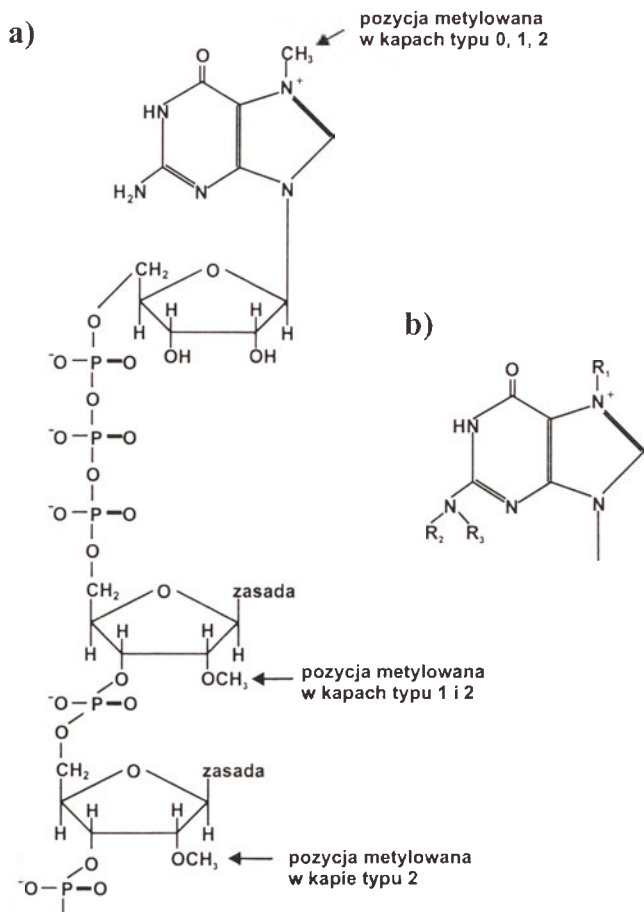
I. Synteza kapu

Zlokalizowana w nukleoplazmie polimeraza RNA II syntetyzuje cząsteczki pre-mRNA i małe jądrowe RNA (snRNA), za wyjątkiem U6 snRNA, a u roślin również U3 snRNA. W jądrze komórek eukariotycznych transkrypty polimerazy RNA II przechodzą serię reakcji dojrzewania [1], z których najważniejsze to:

- a) dojrzewanie końca 5' (ang. *capping*)
- b) dojrzewanie końca 3'
- c) splicing

Dojrzałe cząsteczki RNA transkrybowane przez polimerazę RNA II mają specyficznie zmodyfikowany w wyniku reakcji dojrzewania koniec 5' zwany kapem [2]. Kap (ang. *cap*) to zmetylowana w pozycji N7 reszta guanozyny połączona z pierwszym nukleotydem cząsteczki RNA wiązaniem 5'-5' trifosforanowym (Ryc. 1a.) [3, 4]. Modyfikacja końca 5' zwana kapowaniem (ang. *capping*), zachodzi w wyniku działania kilku enzymów [5, 6]. Pierwszy etap tego procesu to usunięcie grupy γ -fosforanowej z 5' końcowego nukleotydu pierwotnego transkryptu. Reakcję tę katalizuje 5'-trifosfataza RNA [6, 7]. Transkrypt z grupą pirofosforanową na końcu 5' służy następnie jako akceptor reszty guanylowej. Donorem

¹Mgr, ²dr hab.; Zakład Ekspresji Genów, Instytut Biologii Molekularnej i Biotechnologii, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu, ul. Międzychodzka 5, 60-371 Poznań, tel. fax: 0-pręfix-61-8292730



Ryc. 1. Struktura kapu na końcu 5' mRNA. a) Guanozyna połączona jest z końcem 5' transkryptu wiązaniem 5'-5' trifosforanowym. W kapie typu 0 żadna z ryboz nie jest metylowana. W kapie typu 1 metylowana jest jedna ryboza, a w typie 2 dwie rybozy. b) Schemat przedstawiający pozycje na guanozynie, w których podstawione są grupy metylowe. W przypadku: 7-metyloguanozyny grupa metylowa znajduje się w pozycji R_1 , 2,2,7-trimetyloguanozyny grupy metylowe znajdują się odpowiednio w pozycjach R_2 , R_3 i R_1 .

tej reszty jest GTP, a reakcję katalizuje guanyliłotransferaza mRNA. Reakcja dołączenia reszty guanylowej jest dwustopniowa: najpierw tworzy się stabilny kompleks enzym-GMP z eliminacją pirofosforanu, a następnie reszta guanylowa przenoszona jest z kompleksu na koniec 5' transkryptu [8, 9]. Powstały mostek trifosforanowy łączy dobudowany nukleozyd z pierwszym nukleotydem transkryptu poprzez grupy 5'-OH każdego z nich. Proces dołączenia reszty guanylowej do końca 5' RNA u drożdży przeprowadzany jest przez 2 osobne enzymy: trifosfatazę RNA i guanyliłotransferazę RNA [10]. Wyższe Eukaryota zawierają natomiast jeden bifunkcyjny enzym, który na swoim N-końcu posiada aktywność trifosfatazy RNA, a na C-końcu guanyliłotransferazy [11-13].

Zmodyfikowany w opisany powyżej sposób koniec 5' transkryptu ulega następnie metylowaniu.

Metylacja dobudowanej reszty guanylowej w pozycji N7 pierścienia purynowego katalizowana jest przez specyficzną metylotransferazę. Donorem reszty metylowej jest S-adenozylometionina (SAM) [14-16]. Metylowany jest również pierwszy i ewentualnie drugi nukleotyd transkryptu, zazwyczaj jednak w ich części cukrowej (pozycja 2') [16]. W wielu mRNA nukleozydem sąsiadującym z metyloguanozyną jest $N^6,2'$ -O-dwumetyloadenozyna [2, 6, 17].

Proces dojrzewania końca 5' zachodzi kotranskrypcyjnie — tworzące się transkrypty polimerazy RNA II o długości 20-30 nukleotydów posiadają już na swoim 5' końcu metylowaną w pozycji N7 guanozynę [15, 18, 19]. Metylacje dalszych nukleotydów zachodzą po zakończeniu transkrypcji: metylacja w pozycji 2'-O nukleozydu N' odbywa się w jądrze, ale już kolejnego nukleozydu N'' zachodzi w cytoplazmie [20]. Ze względu na ilość grup metylowanych na końcu 5' pre-mRNA możemy wyróżnić trzy rodzaje kapów :

- typ 0 — $m^7GpppN...$ występujący u jednokomórkowych Eukaryota [21]
- typ 1 — $m^7Gppp^{(m)}N_mN...$ występujący u większości Eukaryota [17, 22]
- typ 2 — $m^7GpppN_mN_m...$ występujący u niektórych Eukaryota [23];

N_m oznacza metylację reszty cukrowcowej, a $^{(m)}N$ oznacza metylację pierścienia zasady, jeżeli zasadą tą jest adenina.

Dojrzałe, syntetyzowane przez polimerazę RNA II, małe jądro RNA bogate w urydynę (U snRNA) mają odmienną strukturę kapu. Na ich końcu 5' znajduje się 2,2,7-trimetyloguanozyna (Ryc. 1b) [24]. Podczas transkrypcji snRNA, na ich 5' końcu dobudowany zostaje kap monometylowany, a następnie jest on przekształcany w kap trimetylowany. Hipermetylacja kapu zachodzi w cytoplazmie [25, 26]. Ta dodatkowa metylacja końca 5' niskocząsteczkowych jądro RNA zależy od białek wiążących się do domeny Sm cząsteczek U snRNA [27, 28].

II. Rola kapu

Kap zwiększa stabilność mRNA [29-32]. 7-Metyloguanozyna chroni RNA przed degradacją przez nukleazy. Egzonukleazy komórkowe wykazują wysoką stereospecyficzność, rozróżniając grupy związane z końcem 3' bądź 5' w cząsteczce RNA. Nukleazy dzielą się więc na 3' specyficzne i 5' specyficzne. Dla enzymów obu tych klas modyfikowany koniec 5' eukariotycznego mRNA (wiązanie 5'-5' trifosforanowe) wydaje się być niewłaściwym sub-

stratem. Wykazano, że funkcję ochronną pełni już struktura GpppN [17]. Wydaje się, że metylacje kapu dodatkowo podwyższają „odporność” RNA na nukleazy [32, 33].

Struktura kapu wpływa na efektywność splicingu pierwszego intronu w pre-mRNA, ułatwiając jego wycięcie [22, 34, 35]. Na rolę kapu w tym procesie wskazuje analiza inhibicji splicingu pre-mRNA *in vitro* przez dodanie do ekstraktu analogu struktury kapu (m^7GpppG). W jądrowym ekstrakcie komórek HeLa podanie dinukleotydów et^7GpppG lub m^7GpppG powoduje zahamowanie splicingu. Takie analogi jak $m^{2,7}GpppG$, $m^{2,2,7}GpppG$ i $ApppG$ nie mają wpływu na wycinanie intronów z pre-mRNA [36].

Kap stymuluje transport transkryptów polimerazy RNA II z jądra komórkowego do cytoplazmy [1, 29, 37]. Zsyntetyzowane *in vitro* mRNA z dołączoną 7-metyloguanozyną są transportowane efektywniej aniżeli cząsteczki bez tej modyfikacji. Zmiana dołączanej struktury kapu z GpppN na ApppN powoduje spowolnienie eksportu U snRNA z jądra komórkowego do cytoplazmy [37].

Kap na końcu 5' eukariotycznych mRNA odgrywa również ważną rolę w inicjacji translacji [30]. Wykazano, że struktura kapu ułatwia wiązanie się mRNA z małą podjednostką rybosomową, jak i ułatwia syntezę białka na matrycy takiego mRNA [38]. Istotność tej struktury w inicjacji translacji dodatkowo potwierdzona jest przez strategie kapowania RNA wirusów. Część wirusów posiada własne enzymy zdolne do przeprowadzenia reakcji dojrzewania końca 5' [18, 39, 40]. Inną strategią wykorzystywaną przez wirusy jest kodowanie endonukleazy, która odcina strukturę kapu od cząsteczek RNA gospodarza. Taki kap jest następnie użyty w inicjacji syntezy wirusowego mRNA [41]. Należy jednak wspomnieć, że istnieje i taka grupa wirusów, których RNA nie są kapowane, a mimo to są wydajnymi matrycami w procesie syntezy białka [2]. Za wiązanie się takiego RNA z małą podjednostką rybosomową odpowiedzialna jest tzw. sekwencja IRES (ang. *internal ribosomal entry site*). IRES tworzy charakterystyczną strukturę drugorzędową w obrębie 5' UTR wirusowego RNA [42-44].

Struktura kapu wpływa również na reakcję poliadenylacji 3' końca mRNA. Wykazano, że dodanie do jądrowego ekstraktu komórek HeLa analogu kapu m^7GpppG , powoduje wyraźne spowolnienie poliadenylacji [45-47]. Proces ten nie zostaje jednak zahamowany całkowicie — nawet wysokie stężenie analogu nie powoduje całkowitej inhibicji poliadenylacji [45, 47]. Wykazano również, że niekapowany

pre-mRNA jest gorszym substratem dla reakcji poliadenylacji w jądrowym ekstrakcie komórek HeLa [46, 47].

III. Charakterystyka jądrowych białek wiążących się do kapu

W funkcjach jakie pełni kap pośredniczą białka rozpoznające i wiążące się z tą strukturą [33]. Białka takie nazwano białkami wiążącymi się z kapem (ang. CBP — *cap binding protein*). Białka CBP zidentyfikowano zarówno w cytoplazmie jak i w jądrze komórkowym [48-50]. Główne białko cytoplazmatyczne wiążące się z kapem to dobrze scharakteryzowany czynnik translacyjny eIF-4E (zwany inaczej 24 K-CBP lub CBP I) [51]. Wraz z białkami eIF-4A i eIF-4G buduje ono kompleks eIF-4F (inaczej zwany CBP II) [50]. eIF-4F odgrywa ważną rolę w inicjacji procesu biosyntezy białka u eukariotów umożliwiając wiązanie się cząsteczki mRNA z małą podjednostką rybosomową [22, 30, 52].

Jądrowe białka wiążące się z 7-metyloguanozyną są o wiele gorzej scharakteryzowane. W komórkach HeLa zidentyfikowano kilka takich białek o masach: 120 kDa, 89 kDa, 80 kDa oraz 115 kDa, 20 kDa [22, 53, 54]. Dwa z nich wyizolowano i dokładnie zbadano: CBP20 (o masie 20 kDa) i CBP80 (o masie 80 kDa). Obydwa te białka tworzą kompleks CBC (ang. *cap binding complex*), który specyficznie wiąże się z kapem. Osobno żadne z tych białek nie rozpoznaje 7-metyloguanozyny. Uważa się, że za funkcje kapu w splicingu pre-mRNA, eksporcie RNA z jądra komórkowego do cytoplazmy i tworzeniu łańcucha poliA na 3' końcu pre-mRNA, odpowiedzialny jest właśnie ten kompleks białek jądrowych [36, 55, 56].

Białka kompleksu CBC oczyszczono i częściowo zsekwencjonowano. Sekwencje te następnie użyto do zaprojektowania oligonukleotydów, które wykorzystano do izolacji odpowiednich cDNA z biblioteki cDNA komórek HeLa. Postępując w ten sposób wyizolowano cDNA białka CBP20 kodujący 156-aminokwasowe białko, którego szacunkowa masa wynosiła 17,98 kDa. Białko CBP20 jest wysoce konserwatywne. CBP20 HeLa i *Xenopus* wykazuje 84% identyfikacji i 99% podobieństwa [1, 29], natomiast CBP20 ludzkie i *Drosophila melanogaster* wykazuje 75% identyfikacji [1].

CBP20 należy do dużej rodziny białek zawierających region zbudowany z około 80-100 aminokwasów, które formują domenę wiążącą RNA (ang. *RNA-binding domain*), określaną często jako motyw RNP [57-59]. Charakterystyczną cechą motywu

RNP jest element RNP-CS (ang. RNP *consensus sequence*), który składa się z dwóch krótkich sekwencji — RNP 1 i RNP 2 [29, 58] oraz kilku, najczęściej hydrofobowych, konserwatywnych aminokwasów rozrzuconych po tej domenie [58]. Motyw RNP posiada cztery struktury β i dwie α o wzorze $\beta\alpha\beta\beta\alpha\beta$. RNP 1 znajduje się na β_3 , a RNP 2 na β_1 [59]. Obdarzone ładunkiem i bogate w aminokwasy aromatyczne strony RNP 1 i RNP 2 są eksponowane, i to właśnie one są odpowiedzialne za wiązanie się z RNA. Wysoce konserwatywne aminokwasy w RNP 1 i RNP 2, chociaż krytyczne dla wiązania RNA, prawdopodobnie nie rozróżniają sekwencji nukleotydów [58]. Motyw RNP może zawierać pomocnicze domeny bogate w glicynę, glutaminę, prolinę czy dipeptydy RS. Regiony RS to powtórzenia aminokwasów arginina/seryna. Dokładna rola domeny RS nie jest znana. Posiada ona wysoki ładunek dodatni i dzięki temu może oddziaływać z RNA [60]. Nie można jednak wykluczyć, że domena RS umożliwia również specyficzne oddziaływanie białko-białko [60, 61]. Warto zwrócić uwagę na to, że CBP20, pomimo iż zawiera motyw RNP, nie wiąże się z RNA w nieobecności CBP80 [29, 33].

Badania immunofluorescencyjne wykazały, że większość białka CBP20 znajduje się w jądrze komórkowym. Tylko bardzo małe ilości CBP20 obserwowane są w cytoplazmie [1].

Scharakteryzowano również jądrowe białko CBP o masie 80 kDa. Z biblioteki cDNA komórek HeLa wyizolowano kodujący CBP80 cDNA o długości 2,9 kb [48]. Odpowiada to polipeptydowi o 790 aminokwasach i masie 91,78 kDa [36, 48]. Technika *Southern blot* wykazało, że liczba kopii genu CBP80 w genomie człowieka jest mniejsza niż kilka [48]. Białko CBP80 pochodzące z różnych organizmów wykazuje stosunkowo niską homologię — w odróżnieniu od białka CBP20, które jest niezwykle konserwatywne.

Analiza sekwencji aminokwasowej wykazała, że CBP80 posiada sygnał lokalizacji jądrowej (ang. *nuclear localization signal* — NLS), który odpowiedzialny jest za aktywny transport białka do jądra komórkowego [33]. NLS umiejscowiony jest na końcu N białka (w obrębie pierwszych 70 aminokwasów). Sygnał NLS białka CBP80 stanowią dwa krótkie łańcuchy zasadowych aminokwasów rozdzielonych 10 aminokwasową „przekładką” (ang. *spacer*) [48, 62]. W obrębie sekwencji aminokwasowej CBP80 zlokalizowano również dwa miejsca fosforylacji (dla kinazy S6K), które to pokrywają się z sygnałem NLS. Fosforylacje w tych miejscach stymulują wiązanie się kompleksu CBP80/CBP20 do struktury

kapu [63]. W obrębie CBP80 zlokalizowano również trzy domeny. Każda z nich zbudowana jest z powtarzających się motywów tworzących struktury helikalne [59]. Na N końcu zlokalizowana jest duża α -helikalna domena MIF4G [64]. Domenę tę posiadają, oprócz CBP80, białko eIF-4G (składnik translacyjnego kompleksu inicjującego eIF-4F, w skład którego wchodzi również cytoplazmatyczne białko wiążące się z kapem eIF-4E) [52], NMD2 (ang. *nonsense-mediated mRNA decay*, białko biorące udział w degradacji mRNA posiadających mutacje nonsensowne) [65] oraz Paip-1 (ang. Poly(A) *binding protein-interacting protein*) [66]. Dwie pozostałe helikalne domeny białka CBP80 są bardzo podobne do domeny MIF4G [59]. Jak już wspomniano wcześniej CBP80 nie asocjuje z kapem samodzielnie. Wspólnie z CBP20 (zawierającym domenę RNP), CBP80 tworzy zdolny do wiązania się z 7-metyloguanozyną kompleks CBC (ang. *cap binding complex*) [59, 67]. Oddziaływanie CBP20/ CBP80 możliwe jest dzięki interakcji motywu RNP białka CBP20 z drugą i trzecią helikalną domeną białka CBP80 [59]. Natomiast pierwsza domena białka CBP80-MIF4G prawdopodobnie odpowiedzialna jest za oddziaływanie CBC z takimi białkami jak białko PHAX, eIF-4G, czy też czynniki splicingowe i czynniki uczestniczące w poliadenylacji 3' końca mRNA [59, 68].

CBP80 występuje głównie w jądrze komórkowym [69]. Ze względu na występowanie CBP20 i CBP80 w kompleksie CBC, nie jest zaskoczeniem, że opisana wcześniej lokalizacja białka CBP20 jest również jądrowa [1].

Interakcja pomiędzy kompleksem białek CBP20/CBP80 a kapem jest bardzo specyficzna. Eksperymenty z różnymi analogami kapu wykazały, że guanozynowy kap połączony wiązaniem 5'-5' trifosforanowym z pierwszym nukleotydem mRNA, jak również reszta metylowa w pozycji N7 tej guanozyny, są ważne przy rozpoznaniu kapu przez CBC. Trimetyloguanozynowy kap ($m^{2,2,7}GpppN$), który jest obecny na końcu 5' wielu snRNA, nie jest rozpoznawany przez CBC [22]. Kompleks CBC wiąże się z 7-metyloguanozyną na końcu 5' transkryptów polimerazy RNA II bardzo silnie. Wiązanie może zachodzić nawet w wysokich stężeniach KCl (powyżej 1 M). Dopiero stężenie powyżej 1,55 M wyraźnie je osłabia [54].

IV. Rola CBC w splicingu pre-mRNA

CBC przyłącza się do powstającego pre-mRNA wkrótce po inicjacji transkrypcji, wiążąc się ze strukturą kapu [18, 70, 71]. Pozostaje związany z tą struk-

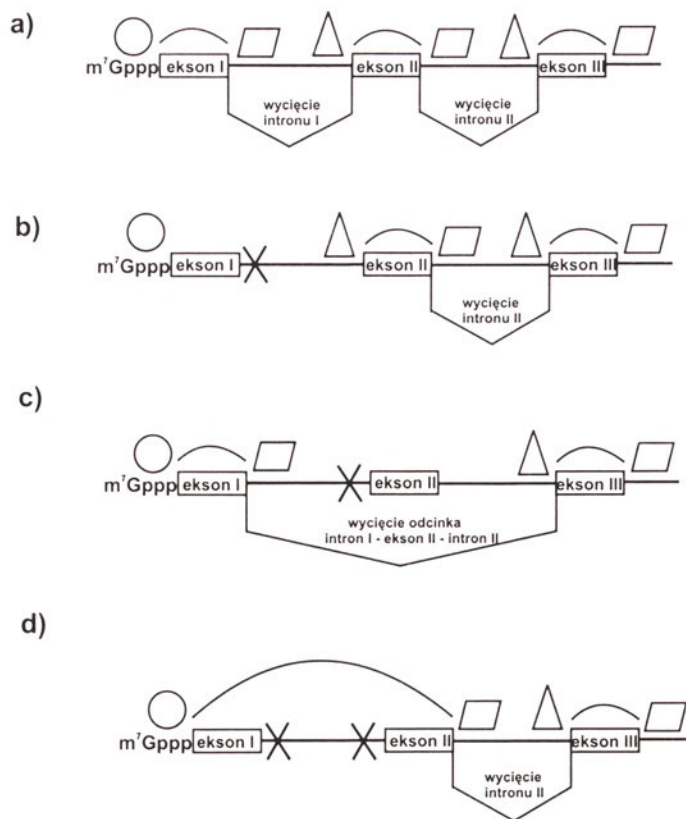
tura jeszcze po splicingu, biorąc udział w transporcie dojrzałych transkryptów polimerazy RNA II z jądra komórkowego do cytoplazmy. Podczas transportu, po cytoplazmatycznej stronie, tuż po przejściu przez otoczkę jądrową CBC odpowiedzialny jest za „wstępną” reakcję translacji białka na matrycy mRNA [72-74].

Szybka asocjacja kompleksu CBP20/CBP80 z powstającym transkrypcyjnym RNA jest związana z rolą jaką CBC pełni w splicingu [33, 55]. Większość genów wyższych eukariotów to geny podzielone. Sekwencje kodujące — eksony są przerywane przez sekwencje niekodujące — introny. Ekspresja takich genów wymaga dokładnego wycięcia intronów z pre-mRNA i ligacji eksonów w procesie zwanym splicingiem. Usuwanie intronów odbywa się z pomocą rybonukleoproteinowych kompleksów zwanych spliceosomami. Maszyna splicingowa, oprócz rybonukleoprotein — snRNP-ów (U1, U2, U5 i U4/U6), zawiera wiele nie do końca jeszcze zidentyfikowanych białek, często nazywanych białkowymi czynnikami splicingu [75]. Sposób, w jaki aparat wycinający rozpoznaje z dużą dokładnością miejsca splicingowe wyjaśnia analiza sekwencji poznanych połączeń intron-ekson w pierwotnych transkryptach polimerazy RNA II. Sekwencje te u eukariotów mają wspólne motywy strukturalne: główna sekwencja intronu zaczyna się od GU, a kończy na AG. Sekwencja zgodna miejsca splicingowego 5' to AGGUAAGU (gdzie pierwsze 2 nukleotydy kończą ekson, a pozostałe 6 podkreślonych rozpoczynają sekwencję intronu). Sekwencja zgodna końca 3' intronu to odcinek około dziesięciu pirymidyn (U lub C), występujący kilka nukleotydów przed stałym dinukleotydem AG kończącym sekwencję intronu. Intron posiada również odcinek zwany miejscem rozgałęzienia BS (ang. *branch site*) znajdujący się między 20. a 50. nukleotydem powyżej miejsca splicingowego 3'. W procesie wycinania intronów i składania eksonów możemy wyróżnić dwie reakcje transestryfikacji. Pierwsza reakcja wymaga rozcięcia pre-mRNA w miejscu splicingowym 5' (miejsce styku eksonu I z intronem) i utworzenia wiązania 2'-5' fosfodiesterowego. Wiązanie to powstaje między resztą adenozyliny zlokalizowaną w miejscu rozgałęzienia BS, a 5' terminalną resztą guanozyliny intronu. W ten sposób formowane są produkty pośrednie reakcji składania: rozcięty ekson I i ekson II połączone z intronem tworzącym strukturę przypominającą laso. Druga reakcja transestryfikacji obejmuje rozcięcie eksonu II połączonego z intronem w miejscu splicingowym 3', oraz ligację dwóch eksonów z ostatecznym uwolnieniem intronu [76].

Podczas splicingu pierwszym tzw. kompleksem prespliceosomalnym jest kompleks E (ang. *early complex*) formujący się bez udziału ATP, a zawierający U1 snRNP i czynnik U2AF (ang. U2 snRNP *auxiliary factor*) [55, 60]. W kompleksie tym, niesparowany koniec 5' U1 snRNA długości 11 nukleotydów wiąże się z miejscem splicingowym 5' pre-mRNA poprzez wiązania wodorowe między nukleotydami pre-mRNA i U1 snRNA (parowanie dotyczy 4-6 nukleotydów). Następnie U2 snRNP wiąże się z miejscem rozgałęzienia BS intronu, w wyniku czego powstaje kompleks A. Przekształcenie kompleksu E w kompleks A wymaga hydrolizy ATP. Po przyłączeniu się U1 i U2 snRNP, końce 5' i 3' intronu zbliżają się do siebie, co umożliwia U1 snRNA parowanie się również z miejscem splicingowym 3'. Do kompleksu U1, U2 snRNP i pre-mRNA przyłącza się wcześniej uformowany kompleks U4-U5-U6 snRNP, tworząc tym samym kompletny spliceosom gotowy do przeprowadzenia reakcji wycięcia intronów i ligacji eksonów.

Wykazano, że struktura kapu jest potrzebna do skutecznego splicingu pre-mRNA *in vitro* w jądrowym ekstrakcie komórek ssaczy. Eksperymenty pokazały, że splicing pre-mRNA zawierających pojedyncze introny jest skutecznie hamowany przez analogi kapu (m⁷GpppG) [35]. Inhibicja splicingu przez takie analogi daje w ostateczności nagromadzenie pre-mRNA z intronami, co sugeruje, że kap jest potrzebny już przed pierwszą reakcją transestryfikacji. Dowody na rolę CBC w splicingu dały doświadczenia z przeciwciałami rozpoznającymi białka należące do tego kompleksu. Stwierdzono, że przeciwciała α CBP20 hamują w oocytach *Xenopus laevis* splicing pre-mRNA (poprzez blokadę wiązania się kompleksu CBP20/CBP80 z 5' końcem mRNA) [29]. Badania wpływu CBC na splicing pre-mRNA z wykorzystaniem przeciwciał prowadzono także *in vitro*. W badaniach tych przeciwciała skierowane przeciwko CBP80 wykorzystano do usunięcia z jądrowego ekstraktu z komórek HeLa kompleksu CBC. Ekstrakt taki był niezdolny do przeprowadzenia reakcji splicingu. Splicing przebiegał prawidłowo po dodaniu do pozbawionego CBC ekstraktu, oczyszczonego kompleksu wiążącego się z kapem [36, 55]. Podanie osobno podjednostki CBP20 lub CBP80 nie przywracało reakcji splicingu, dopiero dodanie obydwu podjednostek razem umożliwiało prawidłowe wycięcie intronu.

CBC jest wymagany do skutecznego rozpoznania miejsca splicingowego 5' przez U1 snRNP podczas formowania wczesnego kompleksu E [55, 77]. Formowanie się kompleksu E w nieobecności CBC nie



Ryc. 2. Schemat przedstawiający model identyfikacji eksonu. m⁷Gppp oznacza strukturę kapu. Prostokąty przedstawiają kolejne eksony, a grube linie łączące eksony to introny. Nad eksonem, lukiem zaznaczono oddziaływania czynników splicingowych, które identyfikują ekson. Jako trójkąty zaznaczono czynniki splicingowe oddziałujące z traktem polipirymidynowym na 3' końcu intronu. Czynniki splicingowe rozpoznające koniec 5' intronu przedstawiono jako romb, a kółkiem zaznaczono kompleks CBC. Ostro zakończone, skierowane w dół linie określają splicing. X oznacza miejsce mutacji. a) Eksony w pre-mRNA identyfikowane są poprzez kooperatywne interakcje pomiędzy czynnikami splicingowymi oddziałującymi z traktem polipirymidynowym na 3' końcu pierwszego intronu (przedstawionymi tutaj jako trójkąty), a czynnikami splicingowymi rozpoznającymi koniec 5' sąsiedniego, następnego intronu (przedstawionymi tutaj jako romby). Zaproponowano, że pierwszy ekson jest rozpoznawany poprzez interakcję pomiędzy kompleksem CBC (przedstawionym jako kółko) a czynnikami splicingowymi rozpoznającymi koniec 5' intronu. Udział CBC w identyfikacji pierwszego intronu potwierdziły eksperymenty przedstawione schematycznie na rys. b), c), d): b) Mutacja miejsca splicingowego 5' pierwszego intronu nie ma żadnego efektu na splicing dalszego intronu, splicing zachodzi w sposób niezależny od struktury kapu. Pierwszy intron nie zostaje wycięty, gdyż jego miejsce splicingowe 5' jest zmutowane. c) Mutacja traktu polipirymidynowego na końcu 3' pierwszego intronu powoduje wycięcie intronu pierwszego wraz z eksonem II i drugim intronem, w sposób zależny od kapu. Czynniki wiążące się do miejsca splicingowego 5' w intronie proksymalnym w stosunku do kapu, oddziałują z CBC. Oddziaływanie to umożliwia identyfikację eksonu I. Ponieważ zmutowany jest trakt polipirymidynowy pierwszego intronu, rozpoznanie eksonu II jest niemożliwe. Interakcja czynników oddziałujących z traktem polipirymidynowym na końcu 3' drugiego intronu i czynników wiążących się do miejsca splicingowego 5' trzeciego intronu, umożliwia rozpoznanie eksonu III. Po rozpoznaniu eksonu I i III sekwencja pomiędzy nimi ulega wycięciu. d) Mutacja zarówno miejsca splicingowego 5', jak i traktu polipirymidynowego pierwszego intronu, powoduje usunięcie drugiego intronu w sposób zależny od struktury kapu.

zachodzi skutecznie. Poprawne formowanie się kompleksu E można przywrócić po dodaniu do ekstraktu pozbawionego kompleksu CBC, obu białek (CBP20 i CBP80) uzyskanych na drodze nadprodukcji w *E. coli* [55]. Wykazano, że CBC stanowi integralną część spliceosomu. Dimer CBP20/CBP80 uczestniczy w rozpoznaniu pre-mRNA, stabilizując wiązanie się U1 snRNP do miejsca splicingowego 5' pierwszego intronu. CBC rozpoczyna więc proces tworzenia aktywnego kompleksu wycinającego introny. Nie wyjaśnione pozostaje jednak nadal, czy CBC uczestniczy w asocjacji U1 snRNP z pre-mRNA w sposób bezpośredni czy też pośredni, kontaktując się z białkami U1 snRNP poprzez inne peptydy [33, 55].

V. Identyfikacja eksonów w pre-mRNA (ang. *exon definition model*). Rola CBC w identyfikacji pierwszego eksonu

Kompleks CBP20/CBP80 potrzebny jest dla skutecznego splicingu pre-mRNA zawierającego kilka intronów tylko w przypadku wycinania intronu leżącego w bezpośrednim sąsiedztwie kapu. W takim pre-mRNA, CBC nie jest potrzebny do wycinania „dalszych” (tzw. ang. *downstream*) intronów [33, 78]. Mimo, że introny posiadają w swojej sekwencji określone stałe elementy to uważa się, że to właśnie eksony są najczęściej rozpoznawane w pre-mRNA. Identyfikowane są one poprzez kooperatywne interakcje pomiędzy czynnikami splicingowymi od-

działającymi z traktem polipirymidynowym na 3' końcu pierwszego intronu (tzw. ang. *upstream*), a czynnikami splicingowymi rozpoznającymi koniec 5' sąsiedniego, następnego (tzw. ang. *downstream*) intronu [79, 80]. Mechanizm taki zakłada model identyfikacji eksonu (ang. *exon definition model*). Ponieważ eksony są zwykle małe (około 150 nukleotydów) to takie właśnie oddziaływanie zdaje się być bardziej prawdopodobne, niż oddziaływania czynników splicingowych znajdujących się na końcach długich intronów. Poza tym, mechanizm taki umożliwia ochronę eksonów przed ich wycinaniem wraz z intronem. Przyjmując jednak powyżej opisany sposób identyfikacji eksonów, natrafiamy na problem rozpoznania dwóch terminalnych eksonów: pierwszego i ostatniego. Pierwszy ekson zamiast potrzebnego końca 3' poprzedzającego go intronu posiada na 5' końcu strukturę kapu. Ostatni ekson natomiast nie posiada potrzebnego do jego rozpoznania miejsca splicingowego 5' intronu, a w tym miejscu występuje sygnał poliadenylacji. W oparciu o model identyfikacji eksonu założono, że pierwszy ekson może być rozpoznawany poprzez interakcję między CBC a czynnikami rozpoznającymi miejsce splicingowe 5' pierwszego intronu [33]. Usunięcie CBC z ekstraktu splicingowego zawierającego pre-mRNA z dwoma intronami powoduje inhibicję splicingu tylko pierwszej sekwencji interweniującej, natomiast wycinanie drugiego intronu zostaje zahamowane w bardzo małym stopniu. Sugeruje to, że rozpoznanie eksonu I i jego wycięcie zachodzi właśnie dzięki strukturze kapu, a w roli tej pośredniczy CBC [55] (Ryc. 2).

VI. Eksport U snRNA

Rolę struktury kapu w eksporcie U snRNA (transkryptów polimerazy RNA II) z jądra do cytoplazmy wykazano na podstawie doświadczeń, w których wykorzystano syntetyczne analogi kapu [24, 37]. Stwierdzono, że kompleks CBC w jądrach komórkowych oocytów *Xenopus laevis* odgrywa zasadniczą rolę w eksporcie U snRNA z jądra komórkowego do cytoplazmy. Wykazano, że transport U snRNA jest skutecznie hamowany przez podanie dinukleotydu m⁷GpppG. Również skutecznie hamowano transport U snRNA przez podanie krótkich, syntetycznych RNA posiadających na swoim końcu 5' struktury m⁷G lub et⁷G [56]. CBC wiążąc się z nadmiarem sztucznie wprowadzonego substratu nie oddziałuje ze strukturą kapu U snRNA, co powoduje zahamowanie eksportu snRNA. Ostateczne dowody na rolę CBC w eksporcie U snRNA dostarczyły ekspery-

menty z przeciwciałami rozpoznającymi ludzkie CBP20. Jak już wspomniano wcześniej, białko to jest wysoce konserwatywne i przeciwciała rozpoznające CBP20 z komórek HeLa rozpoznają również CBP20 z *Chironomus tentans*, *Xenopus laevis* i *Drosophila melanogaster* [1]. W oocytach *Xenopus laevis* przeciwciała rozpoznające CBP20 hamują eksport z jądra komórkowego do cytoplazmy syntetyzowanych przez polimerazę RNA II jądrowych niskocząsteczkowych RNA. Jest to wynik blokowania przez przeciwciała interakcji pomiędzy CBC a kapem na 5' końcu U snRNA [29].

Proces eksportu makromolekuł z jądra komórkowego do cytoplazmy wymaga energii i można go wyśycić nadmiarem substratu [81-83]. W eksporcie niskocząsteczkowych RNA z jądra komórkowego do cytoplazmy bierze udział wiele białek, między innymi: mała GTP-aza Ran wraz ze współdziałającymi z nią białkami: RCC1, Ran BP1 i Ran GAP1 [82, 84]. W jądrze utrzymywane jest wysokie stężenie Ran w formie kompleksu z GTP (RanGTP). RanGTP generowany jest przez zasocjowany z chromatyną czynnik RCC1 (ang. *guanine nucleotide exchange factor*). Transkrypty w jądrze ulegają natychmiast po powstaniu oplaszczeniu przez białka, tworząc kompleksy rybonukleoproteinowe (RNP). Wśród białek tworzących RNP znajdują się peptydy, zwane białkami adaptorowymi, które są rozpoznawane przez odpowiednie receptory eksportu. Wysokie stężenie RanGTP w jądrze komórkowym warunkuje rozpoznanie adaptorów przez te receptory. Po przedostaniu się do cytoplazmy receptory oddysocjują od przetransportowanych z jądra komórkowego substratów. Sygnałem zakończenia procesu eksportu jest wysokie stężenie Ran w formie związanej z GDP. Taka forma Ran dominuje w cytoplazmie dzięki interakcji z białkiem aktywującym GTP-azę — GAP1 (ang. *GTP-ase-activating protein*). GAP1 stymuluje hydrolizę GTP do GDP przez Ran [84,85]. Forma GTP-azy Ran (RanGTP *versus* RanGDP) jest zatem specyficznym sygnałem dla receptora, czy tworzyć kompleks z substratem, czy też od niego oddysocjować.

Niedawno scharakteryzowano białko CRM1 będące receptorem eksportu białka Rev wirusa HIV [86]. Badania CRM1 wykazały, że białko to jest zaangażowane również w eksport U snRNA i 5S RNA. Receptor eksportu CRM1, inaczej zwany eksportyną 1, wiąże się z białkami adaptorowymi posiadającymi sygnał eksportu z jądra komórkowego — NES (ang. *nuclear export signal*) [87]. Białko adaptorowe z kolei związane jest z cząsteczką (np. U snRNA), która ma zostać przetransportowana do

cytoplazmy. W przypadku eksportu U snRNA, które są transkryptami polimerazy RNA II, adaptorem takim jest białko PHAX (ang. *phosphorylated adaptor for RNA export*) [88]. Białko PHAX wiąże się z U snRNA poprzez kompleks CBC [89]. A zatem, podczas eksportu U snRNA z jądra komórkowego do cytoplazmy tworzy się kompleks CRM1/ PHAX/ CBC/ U snRNA.

Jak wspomniano wcześniej, po przeniesieniu niskocząsteczkowych jądrowych RNA do cytoplazmy, kap snRNA zostaje dodatkowo zmetylowany, przekształcając się w $m^{2,2,7}G$ [22]. Ze względu na zaangażowanie snRNP w dojrzewanie prekursorów mRNA, cząstki snRNP muszą powrócić z cytoplazmy do jądra komórkowego. Hipermetylowany kapU snRNA jest ważnym sygnałem powrotu snRNA do jądra komórkowego [27, 90]. Powrót snRNA z cytoplazmy do jądra wymaga oprócz dodatkowej metylacji kapu, obecności funkcjonalnego miejsca Sm — regionu rozpoznawanego przez wspólne dla wielu U snRNA białka. Trimetylowany kap, jak i białka wiążące się z miejscem Sm stanowią sygnał lokalizacji jądrowej (NLS) snRNP [27, 91, 92]. $m^{2,2,7}G$ na 5' końcu snRNA rozpoznawany jest przez receptor importu — snurportynę [93]. Obecność trimetylowanego kapu zabezpiecza przed powtórny eksportem snRNA z jądra komórkowego do cytoplazmy, gdyż trimetylowane kapy nie są rozpoznawane przez CBC [94].

VII. Eksport mRNA

Po transkrypcji i dojrzewaniu cząsteczki mRNA muszą dostać się do cytoplazmy, do miejsca gdzie zachodzi proces syntezy białka — translacja. Transkrypty wydostają się z jądra komórkowego przez pory jądrowe (ang. NPC-*nuclear pore complex*). W jądrze komórkowym mRNA, podobnie jak i inne RNA, ulegają opłaszczeniu przez białka, tworząc kompleksy rybonukleoproteinowe — RNP. Cząsteczki mRNA transportowane są przez por jądrowy w orientacji 5'-3' [1]. Badanie transportu RNA o długości 35-40 kb (75 S RNA), pochodzących z puf politenicznych chromosomów śliniankowych larwy *Chironomus tentans* wykazało, że cząsteczki te są transportowane do otoczki jądrowej, gdzie ulegają rozfałdowaniu i wydłużają się podczas translokacji przez NPC [95]. W nukleoplazmie *Chironomus tentans* badane cząsteczki RNA są widoczne jako granularne struktury o szerokości 30-60 nm i długości 10-15 nm, wygięte w pierścieniopodobną strukturę. Przy dokowaniu RNA do NPC, koniec 5' transkryptu ze strukturą kapu i białkami wiążącymi się do niej, rozpoznaje wejście do kanału. Podczas translokacji

koniec 5' mRNA znajduje się zawsze w centralnym kanale NPC, a dalsza część opłaszczonego transkryptu kontaktuje się z peryferiami pora jądrowego. Interakcja pomiędzy końcem 5' transkryptu i strukturą wejściową kanału uruchamia najprawdopodobniej proces „spustowy” (otwarcie bramki). Możliwe, że zainicjowany jest wtedy proces, który powoduje rozpoczęcie przesuwania się transkryptu przez kanał NPC [95].

W przypadku eksportu mRNA, kap odgrywa dodatkową, nie najważniejszą lecz jedynie stymulującą rolę [82, 94, 95]. Struktura kapu na końcu 5' stymuluje eksport mRNA około dwukrotnie [24].

W cytoplazmie, tuż po wydostaniu się z jądra komórkowego, mRNA poddany jest „wstępnej” translacji, w celu sprawdzenia czy nie posiada on mutacji nonsensownych [73]. Uważa się, że podczas „wstępnej” translacji mRNA związane jest ciągle z kompleksem CBC, który odpowiedzialny jest za przyłączenie mRNA do rybosomu [72]. Po „wstępnej” translacji decydują się losy cząsteczki mRNA. Jeżeli nie będzie ona posiadać żadnych błędów, to mRNA transportowany jest na polirybosomy, gdzie zachodzi intensywna produkcja białka. Wówczas jądrowy kompleks zostaje wymieniony na cytoplazmatyczne białko wiążące się z kapem eIF-4E, które z innymi białkami tworzy kompleks eIF-4F odgrywający ważną rolę w inicjacji translacji. Jeżeli cząsteczka mRNA zawiera mutacje nonsensowne, to jest degradowana (NMD — ang. *nonsense-mediated mRNA decay*) [65, 96, 97].

VIII. Import CBC do jądra komórkowego

CBC wraz z RNA przechodzi przez NPC i jest zauważalny po cytoplazmatycznej stronie NPC. Jak wspomniano wcześniej, CBC jest głównie zlokalizowany w jądrze komórkowym. Oznacza to, że kompleks ten po transporcie RNA, szybko powraca z cytoplazmy do jądra komórkowego. Białka aktywnie transportowane do jądra posiadają sygnał lokalizacji jądrowej (NLS) [33]. CBP80 zawiera taki sygnał NLS, dzięki któremu zostaje szybko przetransportowany do jądra [98]. CBP20 wraca w kompleksie z CBP80 [1]. Z uwagi na niewielką masę cząsteczkową, CBP20 może również przedostawać się przez pory jądrowe w wyniku dyfuzji.

Białka posiadające NLS są importowane przez heterodimerski receptor. Receptor ten zbudowany jest z podjednostek o nazwie importyna α (60 kDa) i importyna β (90 kDa). Importyna α jest odpowiedzialna za wiązanie się z sygnałem NLS białka, które ma zostać przetransportowane do jądra. Jednocze-

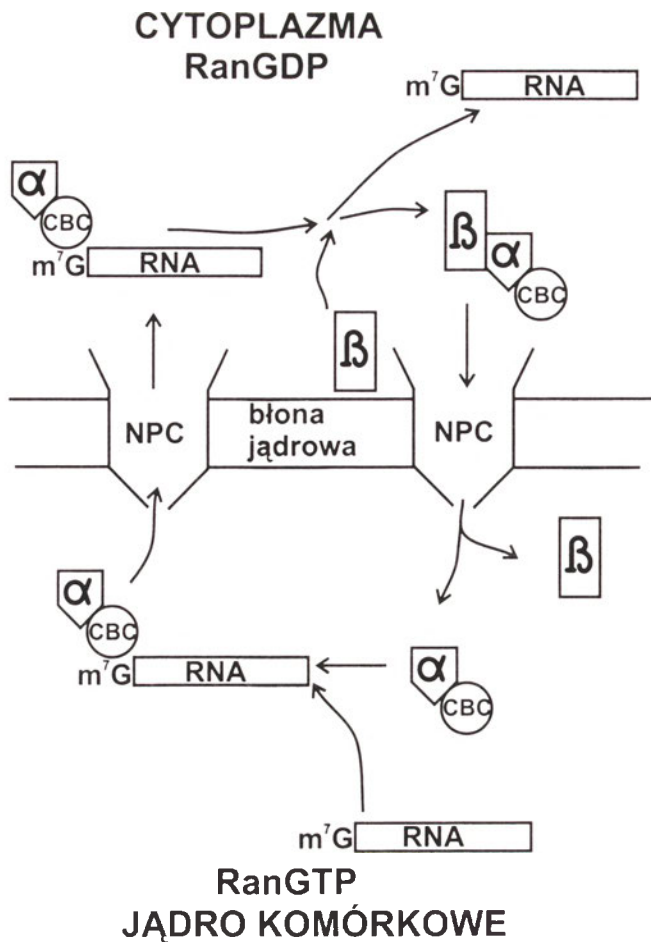
śnie importyna α wiąże się z importyną β poprzez swoją domenę IBB (ang. *importin β binding domain*) [87]. Importyna β jest odpowiedzialna za interakcję z nukleoporynami, czyli za tzw. proces „dokowania” substratu do cytoplazmatycznych włókien kompleksu porowego [33]. Kiedy kompleks receptor-substrat znajdzie się w jądrze komórkowym, dochodzi wówczas do dysocjacji receptora na dwie podjednostki i uwolnienia substratu. Dysocjacja kompleksu importyna α /importyna β zachodzi pod wpływem GTP-azy Ran związanej z GTP. W jądrze importyna β bardzo szybko wiąże się z RanGTP (ta forma białka Ran dominuje w nukleoplazmie), co powoduje jej dysocjację od kompleksu receptor-substrat i umożliwia powrót importyny β do cytoplazmy. Mechanizm uwolnienia substratu od importyny α nie jest znany, wiemy jednak, że oddysocjowanie importyny β od importyny α redukuje powinowactwo tej ostatniej do NLS białka będącego substratem receptora. W cytoplazmie pod wpływem białek cytoplazmatycznych: RanGAP1 i RanBP1, większość GTP-azy Ran występuje w formie związanej z GDP. Taka forma Ran stabilizuje heterodimer importyna α /importyna β . Jak można łatwo zauważyć, również dla receptorów importu sygnałem rozpoznania substratu jest forma białka Ran [85]. Receptory importu reagują odwrotnie na formy GTP-azy Ran niż opisane poprzednio receptory eksportu: forma RanGDP pozwala związać się receptorowi importu z substratem, a RanGTP powoduje dysocjację kompleksu receptor-substrat.

Podczas identyfikacji białek, które wiążą się w jądrze komórkowym z SRP1p — drożdżowym odpowiednikiem importyny α , znaleziono CBP80 — białko kompleksu CBC. Homologiczny kompleks importyny α /CBP80 znaleziono również w oocytach *Xenopus laevis* [33]. Importyna α wiąże się z domeną NLS białka CBP80. Interakcja importyny α z CBP80 różni się od interakcji importyny α z innymi białkami zawierającymi NLS. CBP80 posiada bowiem duże powinowactwo do importyny α . Po drugie, zaobserwowana obecność w jądrze kompleksu importyna α /CBP80 sugeruje, że białko to potrafi zabezpieczyć się przed mechanizmem, który normalnie powoduje dysocjację substratu od importyny α . Ze względu na to, że w jądrze komórkowym znajduje się kompleks importyna α /CBP80/CBP20, interesująca jest rola tego kompleksu w odniesieniu do funkcji CBC. Importyna α /CBP80/CBP20 *in vitro* wiąże RNA w sposób zależny od struktury kapu. Wskazuje to, że CBC może wiązać się z kapem również w kompleksie z importyną α . Importyna α nie jest potrzebna dla przeprowadzenia splicingu *in vitro* w drożdżach i nie przedstawiono też żadnych bezpośred-

nich dowodów na jej udział w eksporcie RNA. Wydaje się jednak, że CBC może opuszczać jądro komórkowe w kompleksie z importyną α i cząsteczką RNA posiadającą 7-metyloguanozynę na swoim 5' końcu. Związanie się w cytoplazmie importyny β z importyną α *in vitro* powoduje dysocjację kompleksu importyna α /CBC/RNA z uwolnieniem RNA i formowanie się kompleksu importyna β /importyna α /CBC. Sugeruje to prosty mechanizm, dzięki któremu CBC dysocjuje od kapowanego RNA w cytoplazmie. Kompleks importyna β /importyna α /CBC gwarantuje szybki powrót CBC do jądra komórkowego. U wyższych eukariotów poziom importyny α i importyny β jest o wiele wyższy aniżeli CBC, a CBP80 posiada wyższe powinowactwo do importyny α niż inne białka posiadające standardowy NLS (Ryc. 3) [33].

IX. Rola CBC w poliadenylacji końca 3' pre-mRNA

Większość eukariotycznych mRNA posiada na końcu 3' cząsteczki tzw. ogon poliA, który powstaje w wyniku specyficznej reakcji dojrzewania [99,100]. Ogon taki zbudowany jest z reszt adenozyliny i nie jest kodowany przez DNA. Reakcja poliadenylacji u kręgowców wymaga dwóch sekwencji w RNA: sekwencji AAUAAA oraz regionu bogatego w U lub w UG, znajdującego się za tym heksamerem. W reakcji poliadenylacji biorą udział białkowe czynniki poliadenylacji: polimeraza poliA [101, 102], czynnik CPSF (ang. *Cleavage and Polyadenylation Specificity Factor*) [103, 104], CstF (ang. *Cleavage stimulatory Factor*) oraz CF1 i CF2 (ang. *Cleavage Factor*) [105]. CPSF wiąże się z pre-mRNA, rozpoznając heksamer AAUAAA. Rozcinanie pre-mRNA jest stymulowane przez grupę czynników rozcinających, które wiążą się z regionem bogatym w U lub UG [106]. Po rozcięciu cząsteczki RNA przez endonukleazę, około 10-30 nukleotydów za charakterystyczną sekwencją AAUAAA [107], polimeraza poliA dodaje około 250 reszt A do końca 3' transkryptu. Donorem reszt adenozyliny jest ATP. Informacyjny RNA pozbawiony ogona poliA może być eksportowany z jądra komórkowego do cytoplazmy, jednak taki mRNA jest znacznie gorszą matrycą podczas syntezy białka, niż mRNA z ogonem poliA [33]. Oprócz wyraźnego wpływu na translację, ogon poliA zabezpiecza również cząsteczkę mRNA przed strawieniem przez nukleazy. Wydaje się, że długość życia cząsteczki mRNA zależy częściowo od tempa degradacji ogona poliA [75]. Jak wspomniano wcześniej, analog kapu (m^7GpppG) dodany do ekstraktu



Ryc. 3. Jądrowo-cytoplazmatyczny transport kompleksu CBC. Receptor importu importyna α /importyna β wraz z CBC powraca przez NPC z cytoplazmy do jądra komórkowego. Receptor oddziałuje bezpośrednio z NLS CBP 80. W jądrze komórkowym, pod wpływem GTP-azy Ran związanej z GTP, importyna β oddysocjowuje od importyny α . Kompleks CBC wiąże cząsteczki RNA posiadające na swoim końcu 5' strukturę kapu. Do CBC dołączona jest nadal importyna α . Kompleks importyna α /CBC/ RNA zostaje przetransportowany do cytoplazmy. W cytoplazmie dochodzi do przyłączenia importyny β , RNA zostaje uwolniony z kompleksu, a importyna α /importyna β /CBC razem wracają do jądra komórkowego.

jądrowego komórek HeLa redukuje tempo poliadenylacji. Jednakże nawet wysokie stężenie analogu nie powoduje całkowitej inhibicji poliadenylacji [45-47]. Reakcję poliadenylacji hamują tylko te analogi kapu, które są rozpoznawane przez CBC. Sugeruje to uwikłanie kompleksu CBC w proces dodawania łańcucha poliA. Bezpośrednich dowodów zaangażowania CBC w reakcję poliadenylacji dostarczyło doświadczenie, w którym usunięto, przy użyciu przeciwciał α CBP80, kompleks CBC z jądrowego ekstraktu komórek HeLa. W ekstrakcie takim poliadenylacja kapowanego pre-mRNA została zahamowana w 80%. Reakcję przywrócono poprzez podanie zrekombinowanego CBC uzyskanego na drodze nadprodukcji w *E. coli* [108]. Uważa się, że CBC umożliwia również pierwszy krok w reakcji

dojrzewania końca 3'. CBC stabilizuje bowiem kompleks CPSF/CstF/RNA tworzący się w jądrowym ekstrakcie komórek HeLa. CBC nie bierze bezpośredniego udziału w reakcji poliadenylacji [108].

Małe jądrowe RNA (snRNA) — inne produkty polimerazy RNA II, nie posiadają ogona poliA lecz kilka dodatkowych nukleotydów na 3' końcu cząsteczki. Nukleotydy te ulegają usunięciu w cytoplazmie. Uważa się, że CBC pośrednio lub bezpośrednio chroni koniec 3' snRNA przed zbyt wczesnym usunięciem dodatkowych nukleotydów, a tym samym chroni cząsteczkę przed nukleazami [33].

Podziękowania

Praca została zrealizowana w ramach projektu badawczego KBN nr 6P04A03511.

Artykuł otrzymano 1 lutego 1999
Zaakceptowano do druku 14 lutego 2002

Piśmiennictwo

1. Visa N, Izaurrealde E, Ferreira J, Danchohl B, Mattaj IW (1996) *Cell Biol* **133**: 5-14
2. Filipowicz W (1978) *FEBS Letters* **96**: 1-10
3. Murthy KGK, Park P, Manley JL (1991) *Nucl Acids Res* **19**: 2685-2692
4. Hakansson K, Wigley DB (1998) *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 1505-1510
5. Wen Y, Shatkin AJ (1999) *Genes Dev* **13**: 1774-1779
6. Wen Y, Yue Z, Shatkin AJ (1998) *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 12226-12231
7. Pei Y, Schwer B, Hausmann S, Shuman S (2001) *Nucl Acids Res* **29**: 387-396
8. Wang SP, Shuman S (1997) *J Biol Chem* **272**: 14683-14689
9. Shuman S, Hurwitz J (1981) *Proc Natl Acad Sci USA* **78**: 187-191
10. Shibagaki Y, Itoh N, Yamada H, Nagata S, Mizumoto K (1992) *J Biol Chem* **267**: 9521-9528
11. Yue Z, Maldonado E, Pillutla R, Cho H, Reinberg D, Shatkin AJ (1997) *Proc Natl Acad Sci USA* **94**: 12898-12903
12. Takagi T, Moore CR, Diehn F, Buratowski S (1997) *Cell* **89**: 867-873
13. Wang SP, Deng L, Ho CK, Shuman S (1997) *Proc Natl Acad Sci USA* **94**: 9573-9578
14. Shuman S (1995) *Prog Nucleic Acids Res Mol Biol* **50**: 101-129
15. Shatkin AJ (1976) *Cell* **9**: 645-653
16. Moss B (1996) W: Fields BN, Knipe DM, Howley PM (red) *Fields Virology*, Lippincott-Raven, Philadelphia, PA 2637-2671
17. Pillutla RC, Yue Z, Maldonado E, Shatkin AJ (1998) *J Biol Chem* **273**: 21443-21446
18. Hagler J, Shuman S (1992) *Science* **255**: 983-986
19. Saldit-Georgieff M, Harpold M, Chen-Kiang S, Darnell J (1980) *Cell* **19**: 69-78
20. Cory S, Adams JM (1975) *J Mol Biol* **99**: 519-547
21. Sripathi CE, Groner Y, Warner JR (1976) *J Biol Chem* **251**: 2898-2904
22. Ohno M, Kataoka N, Shimura Y (1990) *Nucl Acids Res* **18**: 6898-6995
23. Friderici K, Dovenberg M, Rottman F (1976) *Biochemistry* **15**: 5234-5241
24. Hamm J, Mattaj IW (1990) *Cell* **63**: 109-118

25. Reddy R, Ro CT, Henning D, Shibata H, Choi Y, Busch H (1972) *J Biol Chem* **247**: 7245-7250
26. Mattaj IW (1986) *Cell* **46**: 905-911
27. Hamm J, Darzynkiewicz E, Tahara SM, Mattaj IW (1990) *Cell* **62**: 596-577
28. Mattaj IW, De Robertis EM (1985) *Cell* **40**: 111-118
29. Izaurralde E, Lewis J, Gamberi Ch, Jarmolowski A, McGuigan C, Mattaj IW (1995) *Nature* **376**: 709-712
30. Sonenberg N (1981) *Nucl Acids Res* **9**: 1643-1656
31. Inoue K, Ohno M, Sakamoto H, Shimura Y (1989) *Genes Dev* **3**: 1472-1479
32. Furuichi Y, LaFiandra A, Shatkin AJ (1977) *Nature* **266**: 235-239
33. Lewis JD, Izaurralde E (1997) *Eur J Biochem* **247**: 461-469
34. Ohno M, Sakamoto H, Shimura Y (1987) *Proc Natl Acad Sci USA* **84**: 5187-5191
35. Konarska MM, Padgett RA, Sharp PA (1984) *Cell* **38**: 731-736
36. Izaurralde E, Lewis J, McGuigan C, Jankowska M, Darzynkiewicz E, Mattaj IW (1994) *Cell* **78**: 657-668
37. Jarmolowski A, Boelenes WC, Izaurralde E, Mattaj IW (1994) *J Cell Biol* **124**: 627-635
38. Shatkin AJ (1985) *Cell* **40**: 223-224
39. Fresco LD, Buratowski S (1994) *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 6624-6628
40. Shuman S, Liu Y, Schwer B (1994) *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 12046-12050
41. Krug RM, Bouloy M, Plotch SJ (1980) *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **288**: 359-370
42. Pestova TV, Kolupaeva VG, Lomakin IB, Piliipenko EV, Shatsky IN, Agol VI, Hellen ChUT (2001) *Proc Natl Acad Sci USA* **98**: 7029-7036
43. Holcik M, Sonenberg N, Korneluk RG (2000) *Trends in Gen* **16**: 469-473
44. Vagner S, Galy B, Pyronnet S (2001) *EMBO Reports* **2**: 893-898
45. Cooke C, Alwine JC (1996) *Mol Cell Biol* **16**: 2579-2584
46. Hart RP, McDevitt MA, Nevins JR (1985) *Cell* **43**: 677-683
47. Gilmartin GM, McDevitt MA, Nevins JR (1988) *Genes Dev* **2**: 578-587
48. Kataoka N, Ohno M, Kangawa K, Tokoro Y, Shimura Y (1994) *Nucl Acids Res* **22**: 3861-3865
49. Lang V, Zanchin NIT, Lünsdorf H, Tuite M, McCarthy JEG (1994) *J Biol Chem* **269**: 6117-6123
50. Pyronnet S, Imataka H, Gingras AC, Fukunaga R, Hunter T, Sonenberg N (1999) *EMBO J* **18**: 270-279
51. Gingras AC, Gygi SP, Raught B, Polakiewicz RD, Abraham RT, Hockstra MF, Aebersold R, Sonenberg N (1999) *Genes Dev* **13**: 1422-1437
52. Gingras AC, Raught B, Sonenberg N (1999) *Annu Rev Biochem* **68**: 913-963
53. Patzelt E, Blaas D, Kuechler E (1983) *Nucl Acids Res* **11**: 5821-5835
54. Rozen F, Sonenberg N (1987) *Nucl Acids Res* **15**: 6489-6500
55. Lewis JD, Izaurralde E, Jarmolowski A, McGuigan C, Mattaj IW (1996) *Genes Dev* **10**: 1683-1698
56. Izaurralde E, Stepinski J, Darzynkiewicz E, Mattaj IW (1992) *J Cell Biol* **118**: 1287-1295
57. Scherly D, Boelens W, Dathan NA, van Venrooij WJ, Mattaj IW (1990) *Nature* **345**: 502-506
58. Burd ChG, Dreyfuss G (1994) *Science* **265**: 615-621
59. Mazza C, Ohno M, Segref A, Mattaj IW (2001) *Mol Cell* **8**: 383-396
60. Kohtz JD, Jamison SF, Will CL, Zuo P, Lührmann R, Garcia-Blanco MA, Manley JL (1994) *Nature* **368**: 119-124
61. Fu XD (1993) *Nature* **365**: 82-85
62. Dingwall C, Laskey RA (1991) *Trends Biochem Sci* **16**: 478-481
63. Wilson KF, Wu WJ, Cerione RA (2000) *J Biol Chem* **275**: 37307-37310
64. Ponting CP (2000) *TIBS* **25**: 423-426
65. Lykke-Andersen J, Shu M, Steitz JA (2000) *Cell* **103**: 1121-1131
66. Marcotrigiano J, Lomakin IB, Sonenberg N, Pestova TV, Hellen CU, Burley SK (2001) *Mol Cell* **7**: 193-203
67. Kataoka N, Ohno M, Moda J, Shimura Y (1995) *Nucl Acids Res* **23**: 3638-3641
68. Fortes P, Inada T, Preiss T, Hentze MW, Mattaj IW, Sachs AB (2000) *Mol Cell* **6**: 191-196
69. Izaurralde E, McGuigan C, Mattaj IW (1995) *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol* **60**: 669-675
70. Coppola JA, Field AS, Luse DS (1983) *Proc Natl Acad Sci USA* **80**: 1251-1255
71. Rasmussen EB, Lis JT (1993) *Proc Natl Acad Sci USA* **90**: 7923-7927
72. Ishigaki Y, Li X, Serin G, Maquat LE (2001) *Cell* **106**: 607-617
73. Orphanides G, Reinberg D (2000) *Nature* **407**: 471-475
74. Hentze MW, Kulozik AE (1999) *Cell* **96**: 307-310
75. Lewin B (1994) *Genes V*, Oxford University Press and Cell Press
76. Stryer L (1997) *Biochemia.*, PWN Warszawa, 909-928
77. Fu XD, Maniatis T (1992) *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 1725-1729
78. Chiara MD, Reed R (1995) *Nature* **375**: 510-513
79. Robberson BL, Cote GJ, Berget SM (1990) *Mol Cell Biol* **10**: 84-94
80. Niwa M, MacDonald CC, Berget SM (1992) *Nature* **360**: 277-280
81. Görlich D, Mattaj IW (1996) *Science* **271**: 1513-1518
82. Izaurralde E, Mattaj IW (1995) *Cell* **81**: 153-159
83. Dargemont C, Kühn LC (1992) *J Cell Biol* **118**: 1-9
84. Cheng Y, Dahlberg JE, Lund E (1995) *Science* **267**: 1807-1810
85. Kmiecik M, Szwejkowska-Kulińska Z, Jarmolowski A (1999) *Postępy Biochemii* **45**: 271-285
86. Fornerod M., Ohno M., Yoshida M., Mattaj IW (1997) *Cell* **90**: 1051-1060
87. Stade K, Ford ChS, Guthrie Ch, Weis K (1997) *Cell* **90**: 1041-1050
88. Ohno M, Segref A, Bachi A, Wilm M, Mattaj IW (2000) *Cell* **101**: 187-198
89. Segref A, Mattaj IW, Ohno M (2001) *RNA* **7**: 351-360
90. Fischer U, Darzynkiewicz E, Tahara S, Dathan N, Lührmann R, Mattaj IW (1991) *J Cell Biol* **113**: 705-714
91. Fischer U, Lührmann R (1990) *Science* **249**: 786-790
92. Fisher U, Sumpter V, Sekine M, Satoh T, Lührmann R (1993) *EMBO J* **12**: 573-583
93. Huber J, Cronshagen U, Kadokura M, Marshall-say C, Wada T, Sekine M, Lührmann R (1998) *EMBO J* **17**: 4114-4126
94. Shen EC, Stage-Zimmermann T, Chui P, Silver PA (2000) *J Biol Chem* **275**: 23718-23724
95. Mehlin H, Daneholt B, Skoglund U (1995) *Cell Biol* **129**: 1205-1216
96. Serin G, Gersappe A, Black JD, Aronoff R, Maquat LE (2001) *Mol Cell Biol* **21**: 209-223
97. Maquat LE (2000) W: Sonenberg N, Hershey JBW, Mathews MB (red) *Translational Control of Gene Expression*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, str. 849-868
98. Görlich D, Kraft R, Kostka S, Vogel F, Hartmann E, Laskey RA, Mattaj IW, Izaurralde E (1996) *Cell* **87**: 21-32
99. Keller W (1995) *Cell* **81**: 829-832
100. Wahle E (1995) *Biochim Biophys Acta* **1261**: 183-194

101. Raabe T, Bollum FJ, Manley JL (1991) *Nature* **353**: 229-234
102. Wahle E (1991) *J Biol Chem* **266**: 3131-3139
103. Bienroth S, Wahle E, Suter-Crazzolara C, Keller W (1991) *J Biol Chem* **266**: 19768-19776
104. Murthy KGK, Manley JL (1992) *J Biol Chem* **267**: 14804-14811
105. Takagaki Y, Manley JL, MacDonald CC, Wilusz J, Shenk T (1990) *Genes Dev* **4**: 2112-2120
106. Lamond AI (1995) *Pre-mRNA Processing.*, Springer-Verlag, Heidelberg, Germany
107. Proudfoot NJ, Brownlee GG (1976) *Nature* **263**: 211-214
108. Flaherty SM, Fortes P, Izaurrealde E, Mattaj JW, Gilmartin GM (1997) *Proc Acad Sci USA* **94**: 11893-11898

Powstawanie i funkcje białek wirusa zapalenia wątroby typu C

Processing and functions of hepatitis C virus

MAŁGORZATA SIDORKIEWICZ

Spis treści:

- I. Wprowadzenie
- II. Organizacja genomu HCV
- III. Powstawanie białek HCV
- IV. Charakterystyka białek strukturalnych
 - IV-1. Białko nukleokapsydu
 - IV-2. Białka powierzchniowe
- V. Białka niestrukturalne
- VI. Podsumowanie

Wykaz stosowanych skrótów: aa — aminokwas (ang. *amino acid*), gp — glikoproteina, HCV — wirus zapalenia wątroby typu C (ang. *hepatitis C virus*), HVR — rejon hiperzmienny (ang. *hypervariable region*), IFN — interferon, IRES — wewnętrzne miejsce wiązania z rybosomem (ang. *internal ribosome entry site*), NF- κ B — czynnik transkrypcyjny (ang. *nuclear factor of kappa chain B cells*), NS — niestrukturalne (ang. *non-structural*), ORF — otwarta ramka odczytu (ang. *open reading frame*), nt. — nukleotyd, UTR — rejon niepodlegający translacji (ang. *untranslated region*), TNF — czynnik martwicy nowotworu (ang. *tumor necrosis factor*).

I. Wprowadzenie

W połowie lat 70-tych stało się jasne, że inny czynnik niż wirus zapalenia wątroby typu A (HAV) czy B (HBV) odpowiedzialny jest za rozwój większości przypadków potransfuzyjnego zapalenia wątroby [1]. Jednak identyfikacja wirusa określanego „roboczo” nie-A, nie-B, stała się możliwa dopiero po zastosowaniu metod rekombinacji DNA. W 1989 sklonowano genom nowego wirusa hepatotropowego [2, 3] i określono go jako wirus zapalenia wątroby typu C (HCV). Analiza sekwencji genomu wielu wyizolowanych linii HCV [4-6] pozwoliła wywnioskować, że składa się on z pojedynczej dodatniej (+) nici RNA. Nici ta zawarta jest w nukleokapsydzie [1], któ-

Contents:

- I. Introduction
- II. Organization of the HCV genome
- III. Processing pathway of HCV proteins
- IV. Characterization of structural proteins
 - IV-1. Nucleocapsid protein
 - IV-2. Envelope proteins
- V. Nonstructural proteins
- VI. Conclusions

ry z kolei otoczony jest przez zawierającą lipidy otoczkę białkową [7]. Podobna, chociaż nie identyczna budowa genomu z sekwencjami niepodlegającymi translacji (UTR) na 5' i 3' końcach pojedynczej, otwartej ramki odczytu (ORF) charakterystyczna jest dla flawi- i pestivirusów [8, 9]. W oparciu o te podobieństwa, HCV zakwalifikowano jako odrębny genus rodziny *Flavoviridae* [5, 10].

Brak systemu umożliwiającego replikację HCV *in vitro* stanowi poważną przeszkodę w rozwoju badań nad cyklem życiowym HCV oraz w opracowywaniu skutecznych leków antywirusowych. Mimo tych ograniczeń ogromny postęp dokonał się w badaniach opartych na translacji i ekspresji genów HCV w komórkach *in vitro*. Badania te umożliwiły poznanie białek wirusa i przypisanie im określonych funkcji. Celem niniejszej pracy jest przedstawienie aktualnego stanu wiedzy dotyczącej sposobu formowania dojrzałych białek HCV oraz przypuszczalnej roli tych białek w cyklu życiowym wirusa.

II. Organizacja genomu HCV

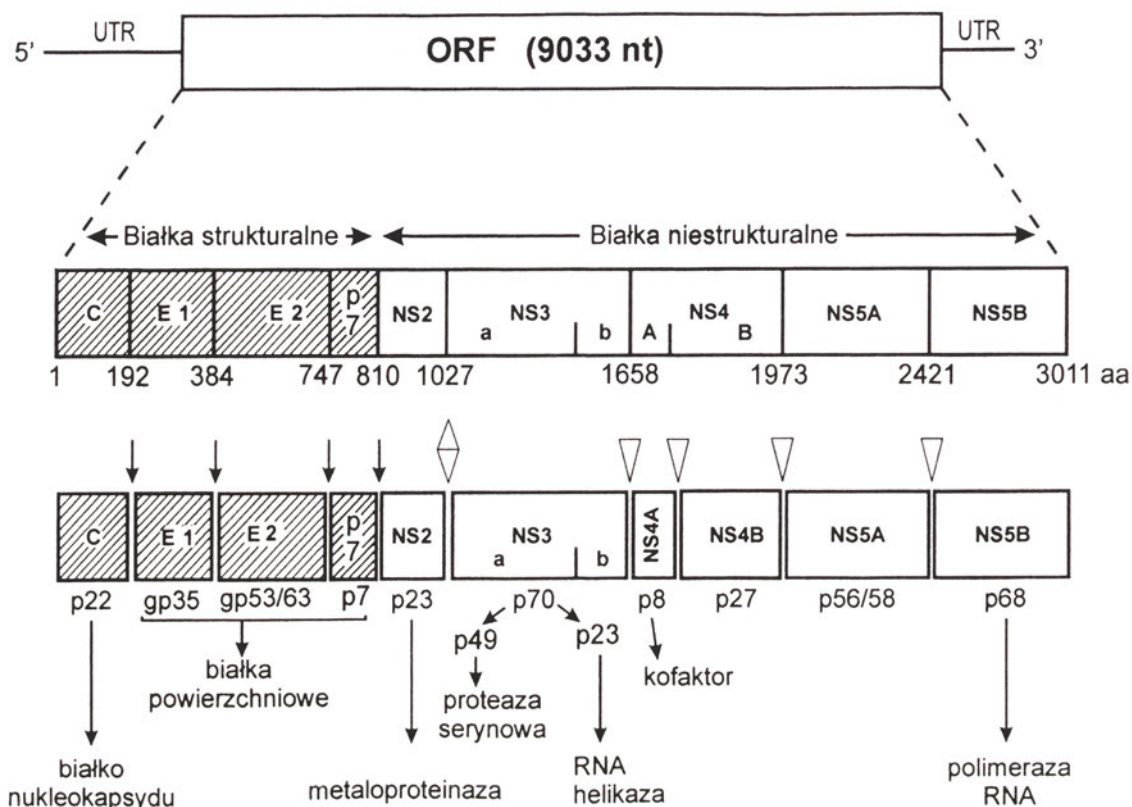
Genom HCV (Ryc. 1) stanowi (+) nici RNA o długości około 9,5 tys. nukleotydów [5]. Składa się on z mało zmiennego, niepodlegającego translacji regionu na końcu 5' (5' UTR). Za 5' UTR występuje jedna otwarta ramka odczytu (ORF) o długości 9033-9066 nukleotydów, za którą, na końcu 3' znajduje się kolejny region niepodlegający translacji-3'UTR (Ryc.1). Pierwotnym produktem translacji

Dr; Zakład Biochemii, IFiB, Akademii Medycznej w Łodzi, 90-131 Łódź, ul. Lindleya 6; e-mail: msidor@csk.am.lodz.pl

wirusowego ORF jest poliproteina (Ryc. 1) o długości ponad 3 tys. aminokwasów [11].

Analiza genomu wirusowego sugeruje, że tak jak inne flavowirusy, koduje on RNA-zależną polimera-

kazano, że wiele białek pochodzenia komórkowego ma wpływ na aktywność translacji zależnej od IRES m.in. antygen La, heterogenne jądrowe białka rybosomalne, białko wiążące pirymidyny [16-18].



Ryc. 1. Organizacja genomu HCV i powstawanie białek wirusa. W genomie zaznaczono otwartą ramkę odczytu (ORF) oraz rejony niepodlegające translacji (3'UTR i 5'UTR). W pierwotnej poliproteinie zaznaczono obszary, z których powstają białka strukturalne i niestrukturalne. Zaznaczono miejsca działania peptydaz sygnalowych pochodzenia komórkowego (↓), oraz NS2-3 metaloproteinazy (◇) i NS3 proteazy serynowej (▽) pochodzenia wirusowego. Podano masy cząsteczkowe dojrzałych białek HCV oraz ich przypuszczalne funkcje.

zę RNA, która syntetyzuje kwas rybonukleinowy bez uczestnictwa intermediatu DNA [12]. Genomowe RNA funkcjonuje więc zarówno, jako m-RNA w procesie translacji oraz jako matryca do syntezy (-) nici RNA w procesie replikacji wirusa. Wirusową nić (-) RNA wykryto jednak nie tylko w hepatocytach gdzie proces replikacji zachodzi, ale także w surowicach osób zakażonych [13], przy czym nić (+) występuje zawsze wewnątrz opłaszczonego nukleokapsydu, natomiast nić (-) pojawia się tylko w połączeniu ze strukturami membranowymi i białkami powierzchniowymi wirusa [13].

5' UTR ma długość ok. 340 nukleotydów i jest silnie konserwowany w różnych liniach wirusa. Na 5' końcu wirusowego RNA nie występuje struktura tzw. „czapeczki”. Natomiast w obrębie 5' UTR zawarta struktura IRES (ang. *internal ribosome entry site*), która umożliwia bezpośrednie wiązanie rybosomów do wirusowego RNA i niezależne od struktury „czapeczki” rozpoczęcie translacji [14, 15]. Wy-

3' koniec genomu HCV (3' UTR) to również rejon niepodlegający translacji. Funkcje 3' UTR HCV są jednak mniej poznane. 3' UTR składa się z krótkich homopolimerów poli (U) i poli (A) [19] oraz 98 nukleotydowej sekwencji określonej jako 3' ogonek X [20]. Wykazano możliwość tworzenia struktury pętli w tym rejonie [20]. „3' ogonek X” wpływa na wydajność translacji wirusowego RNA zależnej od IRES, co w konsekwencji oddziałuje na proces replikacji HCV [19, 21]. Sekwencje homopolimeryczne odznaczają się dużą zmiennością pośród różnych genotypów HCV, natomiast sekwencja „ogonek X” jest silnie konserwowana, podobnie jak 5' UTR.

III. Powstawanie białek HCV

Zarówno replikacja, jak i translacja HCV zachodzi w cytoplazmie hepatocytu, gdzie nie występuje metylotransferaza odpowiedzialna za modyfikację 5' końca RNA tj. tworzenie czapeczki 5'-metylogu-

anozyny. Proces translacji wirusowego RNA odbywa się więc tylko dzięki wspomnianej sekwencji IRES. Sekwencja ta znajduje się pomiędzy 40 i 355 nukleotydem i składa się z czterech odrębnych domen złożonych z ramienia i pętli [14,15]. Jak wykazano wiązanie sekwencji IRES z podjednostką rybosomalną nie wymaga obecności dodatkowych czynników translacyjnych, co przypomina interakcję prokariotycznej podjednostki rybosomalnej 30S z sekwencją Shine-Dalgarno [22]. Zaobserwowano nasilenie IRES-zależnej translacji w okresie podziału mitotycznego komórki, co może wskazywać na regulacyjny wpływ czynników komórkowych, których obecność zależy od fazy cyklu komórkowego [23].

Synteza 10 strukturalnych i niestrukturalnych białek z prekursorowej poliproteiny (Ryc. 1) kodowanej przez wirusowe ORF odbywa się dzięki enzymatycznej aktywności komórkowych i wirusowych proteaz [24, 25]. Prekursorowa poliproteina zawiera w części aminoterminalnej białka strukturalne tj. białko nukleokapsydu (C) zwane również białkiem rdzeniowym i białka powierzchniowe (E1 i E2), które stanowią około jedną trzecią pierwotnego produktu translacji.

W skład pozostałej części wchodzi prekursorowe sekwencje białek niestrukturalnych (Ryc.1). Cała kodowana przez HCV poliproteina zawiera kolejne sekwencje następujących białek wirusowych: NH2-C-E1-E2-p7-NS2-NS3-NS4A-NS4B-NS5A-NS5B-COOH [25, 26]. Podobny układ białek występuje u wszystkich przedstawicieli flavivirusów i pestivirusów [8, 9].

Dojrzewanie białek strukturalnych HCV zależne jest od pochodzących z komórek gospodarza sygnałów zlokalizowanych w przestrzeni retikulum endoplazmatycznego.

Białko C uwalniane jest z prekursora dzięki działaniu komórkowej sygnalizacji, która hydrolizuje wiązanie peptydowe występujące pomiędzy 191 i 192 aa [27, 28]. Na podstawie identyfikacji N-końca białka E1 wywnioskowano, że miejsce ulegające hydrolizie znajduje się przed hydrofobową sekwencją aminokwasową, służącą jako sekwencja sygnałowa białka E1 [27]. Oddzielenie białka E1 od białka E2 odbywa się dzięki, katalizowanej przez komórkową sygnalizację, hydrolizie wiązania peptydowego pomiędzy 383 i 384 aminokwasem.

W przeciwieństwie do bardzo szybkiego uwalniania białka rdzeniowego i białka E1, tworzenie białka E2 zachodzi wolniej, dzięki czemu wykrywany jest produkt pośredni tego procesu w postaci cząstki E2-p7-NS2 [29, 30]. Hydroliza wiązania peptydowego pomiędzy białkiem E2 i p7 oraz p7 i NS2 jest

prawdopodobnie także katalizowana przez komórkową sygnalizację, lecz z inną wydajnością. Oddzielenie p7 od NS2 następuje stosunkowo szybko, natomiast szybkość hydrolizy połączenia E2/p7 zależy od genotypu wirusa [31].

Za dojrzewanie białek niestrukturalnych odpowiedzialne są, co najmniej dwie proteiny, kodowane przez genom wirusa. Połączenie pomiędzy białkiem NS2 i NS3 hydrolizowane jest przez proteinę NS2-3, na którą składa się białko NS2 oraz N-końcowy fragment białka NS3 [32, 33]. Zmniejszenie aktywności proteolitycznej tego enzymu w obecności związków chelatujących oraz wzrost aktywności przy stymulacji jonami Zn^{2+} sugeruje, że kodowana przez NS2-3 proteina jest zależną od cynku metaloproteiną. W obrębie proteiny NS2-3 zawarta jest także aktywność proteiny typu serynowego (proteina NS3), przy czym obie aktywności enzymatyczne funkcjonują w sposób niezależny od siebie. Proteina typu serynowego (NS3) odpowiedzialna jest za rozdzielanie następujących regionów białka prekursorowego: NS3 od 4A, NS4A od 4B, NS4B od 5A i NS5A od 5B. Nie jest dokładnie poznany zależny od NS3 mechanizm dojrzewania białek niestrukturalnych. Prawdopodobnie hydroliza wiązania pomiędzy NS3 i NS4A następuje już w trakcie translacji poprzez interakcję aminoterminalnej sekwencji proteiny NS3 z NS4 na powstającym prekursorze poliproteinowym. Po hydrolizie tworzony jest stabilny kompleks NS3/4A, który bierze udział w trawieniu pozostałych miejsc, jako czynnik typu *trans* [25].

IV. Charakterystyka białek strukturalnych

IV-1. Białko rdzeniowe

Jak wspomniano, nukleokapsydowe białko C, inaczej określane jako białko rdzeniowe, oddzielane jest z N-końcowej części wirusowej poliproteiny przez peptydazę sygnałową pochodzenia komórkowego. W porównaniu z innymi białkami strukturalnymi oraz niestrukturalnymi sekwencja aminokwasowa białka rdzeniowego jest silnie konserwowana w różnych liniach HCV [11, 34]. Białko ma charakter silnie zasadowy, nie podlega glikozylacji, a jego masa określana jest według różnych badań w przedziale od 16 do 23 kD [34-36]. Białko C wykrywane jest głównie w cytoplazmie, choć wykryto jego obecność również w jądrze komórkowym [35, 36]. Translokacja do jądra komórki jest możliwa dzięki obecności zgrupowania aminokwasów zasadowych w N-końcowej części białka [37]. C-końcowa część

białka rdzeniowego ma charakter hydrofobowy i uważana jest za domenę transmembranową, która umożliwia uwolnienie białka rdzeniowego do membran retikulum endoplazmatycznego [37].

Wykazano, że białko rdzeniowe wiąże wiele białek pochodzenia komórkowego i wirusowego [38-40]. Samo białko C ma zdolność tworzenia kompleksów homodimerycznych, zaś z białkiem powierzchniowym E1 tworzy stabilny kompleks heterodimeryczny [38]. Tworzenie tego ostatniego kompleksu może stanowić *in vivo* istotny etap w morfogenezie cząstki HCV. Białko rdzeniowe wiąże się z wieloma białkami komórkowymi: apolipoproteina AII, z receptorem limfotoksyny β (LT β R) oraz receptorami z nadrodziny TNF. Poprzez te oddziaływania, HCV może mieć istotny wpływ w zakażonej komórce na metabolizm lipidów, system odpornościowy komórki, regulację apoptozy. W przypadku wiązania receptora LT β z białkiem rdzeniowym może dochodzić do cytotoksycznego efektu i aktywacji NF- κ β , za które receptor ten jest odpowiedzialny. Komórki HeLa, w których synteza białka rdzeniowego przebiega konstytutywnie, wykazują zdolność do hamowania apoptozy [41]. Inne badania wykazały z kolei, że ekspresja białka rdzeniowego powoduje wrażliwość komórek linii: HepG2, HeLa, czy BC 10 ME na apoptozę indukowaną poprzez aktywację błonowych receptorów z nadrodziny TNF: TNF-R1 [39] oraz poprzez receptor Fas [42]. Wiele badań wykazało także, że białko rdzeniowe HCV ma wpływ na regulację ekspresji genów wirusowych i komórkowych. I tak białko C aktywuje promotor genu *c-myc* oraz LTR wirusa mięsaka Rousa (RSV), hamuje zaś promotor genu *c-fos*, p53 oraz promotory genów zależnych od retinoblastomy, β IFN, β aktywny, HBV i HIV [43-46].

Wykazano, że u transgenicznych myszy [47] charakteryzujących się wysoką ekspresją genu białka C rozwija się stłuszczenie wątroby (*hepatic steatosis*). Podobne eksperymenty pokazały, że białko rdzeniowe ma bezpośredni wpływ na rozwój pierwotnego raka wątroby [48]. Stanowi to pierwszy dowód na możliwość udziału białka C w transformacji nowotworowej *in vivo*. W badaniach *in vitro* pokazano także, że ekspresja genu białka rdzeniowego prowadzi do unieśmiertelnienia pierwotnych ludzkich hepatocytów [49].

IV-2. Białka powierzchniowe

Genom HCV koduje dwie glikoproteiny powierzchniowe E1 i E2, mające charakter białek transmembranowych. Dla białek tych znaleziono liczne

miejsca N-glikolizacji: 5-6 dla E1 i odpowiednio 9-11 miejsc dla E2 [50]. Powstanie białka E1 i E2 uwarunkowane jest hydrolizą wiązań peptydowych pomiędzy 383 i 384 oraz pomiędzy 746 i 747 aminokwasem, za które odpowiedzialna jest sygnalizacja komórkowa gospodarza [51]. Całkowita hydroliza pomiędzy 746 a 747 aminokwasem prowadzi do powstania dojrzałego białka E2, którego masa (gp53/63) zależy od stopnia glikozylacji, oraz małego silnie hydrofobowego białka p7 również mającego charakter transbłonowy. Jeśli całkowita hydroliza nie zachodzi, pojawiać się może dłuższa „wersja” białka E2, której koniec przypada na 809 aminokwas [50]. W białku tym C-końcowy fragment stanowi hydrofobowe białko p7. Nie znana jest biologiczna rola białka p7 oraz znaczenie dwóch form białka E2.

Istotną cechą białek E1 i E2 jest zmienność sekwencji wynikająca z dużej zmienności sekwencji nukleotydowej w rejonie E1 i E2 genomu HCV w poszczególnych izolatach wirusowych. Cecha ta uważana jest za sposób „ucieczki wirusa” przed odpowiedzią immunologiczną gospodarza. W białku E2 znajdują się dwa krótkie, tzw. hiperzmiennne regiony: HVR1 i HVR2 (ang. *hypervariable region*). HVR1 obejmuje sekwencje pomiędzy 386 i 411 aa na N-końcu białka E2 i jest najbardziej zmiennym rejonem w całym genomie HCV, a jego zmienność jest obserwowana nawet w czasie rozwoju choroby u poszczególnych pacjentów [52]. Przeciwciała skierowane przeciw HVR1 wyizolowane z surowicy pacjenta wykazują hamowanie wiązania HCV do komórek w hodowli tkankowej [53]. Surowice królicze otrzymane po immunizacji zwierząt syntetycznym peptydem odpowiadającym rejonowi HVR1, zapobiegają rozwojowi infekcji HCV w komórkach hodowli tkankowej [54]. Co więcej surowice takie chronią szympansy przed zakażeniem HVC [55] co sugeruje, że HVR1 zawiera epitopy odpowiedzialne za indukcję neutralizujących przeciwciał przeciw HCV.

Białko E2 wykazuje interakcję z indukowaną przez IFN- α , aktywowaną przez dwuniciowe RNA, kinazą białkową. Enzym ten zmniejsza syntezę białek komórkowych w wyniku fosforylacji czynnika inicjującego translację eIF2- α . W komórkach zawierających białko E2, kinaza białkowa jest hamowana, co umożliwia translację wirusowego RNA w obecności IFN [56]. Podobny wpływ na skuteczność działania IFN ma niestrukturalne białko NS5A, co opisane jest w części poświęconej NS5.

Białka powierzchniowe odpowiedzialne są za wnikiwanie HCV do hepatocytu. Pierwszym etapem

penetracji HCV do komórki docelowej jest specyficzne połączenie wirusa z receptorem na powierzchni błony komórkowej. Przeciwciała anty-E2 specyficznie blokują wiązanie wirusa z komórką [53, 55], co sugeruje, że „od strony wirusa” białko E2 odpowiada za wiązanie z komórką gospodarza. Rola białka E1 w tym procesie nie jest tak dobrze poznana. Obecność w jego strukturze zgrupowania sekwencji aminokwasów hydrofobowych sugeruje, że E1 ma udział w wiązaniu błon komórkowych [57]. Białka E1 i E2 tworzą stabilną strukturę heterodimeru, która prawdopodobnie prezentuje natywną formę obecną w otoczce HCV [31]. Bez udziału białka E1 fuzja białka E2 z błoną jest niemożliwa.

Nie jest do końca wyjaśnione, który receptor komórkowy odpowiedzialny jest za wiązanie HCV. Do roli tej kandyduje ludzkie białko CD81 [58] oraz receptor lipoprotein o małej gęstości (LDL-R) [59]. Białko CD81 jest członkiem superrodziny tetraspanin i ulega ekspresji na powierzchni różnego typu komórek. Wiązanie białka E2 do cząstki CD81 jest hamowane przez neutralizujące przeciwciała, przy czym CD81 wiąże nie tylko E2, ale również całe cząstki HCV.

Opierając się na obserwacji, że cząstki HCV są związane z β -lipoproteinami [60] analizowano, czy w endocytozie HCV pośredniczy receptor LDL [59], tak jak ma to miejsce u innych przedstawicieli rodziny *Flavoviridae*. Używając techniki hybrydyzacji *in situ* dla określenia komórek HCV-RNA-pozytywnych znaleziono wyraźną korelację pomiędzy poziomem receptorów LDL, ulegających ekspresji na powierzchni komórki, a liczbą komórek HCV-RNA (+). Znamienne jest oprócz tego, że HCV nie wiąże się do komórek COS-7, jeżeli komórki te nie są transfekowane genem receptora LDL [61]. Dodanie lipoprotein o niskiej gęstości w stężeniu powyżej 200 (g/ml powoduje z kolei całkowite zablokowanie wiązania HCV do ludzkich fibroblastów *in vitro*. Sugeruje to, że cząstki HCV oraz LDL współzawodniczą o receptor LDL, a poziom LDL w surowicy pacjentów może regulować wiązanie HCV do tych receptorów [61].

Zarówno CD81, jak i receptor LDL ulegają ekspresji na powierzchni hepatocytów konstytutywnie i niezależnie od stanu zapalenia wątroby [62]. Jednak na podstawie dotychczasowych wyników trudno jest jednoznacznie rozstrzygnąć, który z omówionych receptorów bierze udział w zakażeniu *in vivo* [62].

V. Białka niestrukturalne

Białka niestrukturalne NS2-NS5B (NS, ang. — *nonstructural*), czyli nie biorące udziału w tworzeniu

struktury cząstki wirusowej, są niezbędne w procesie replikacji wirusowego RNA oraz procesie dojrzewania białek wirusowych [63]. Nazwy białek, jakie nadano niestrukturalnym białkom HCV, odpowiadają analogicznym białkom flawiwirusów i pestiwirusów [8, 9].

NS2

Białko NS2 jest transmembranowym białkiem o masie ok. 23 kD, znajdującym się pomiędzy 810 i 1026 aa w obrębie pierwotnej wirusowej poliproteiny [64]. Białko NS2 i N-końcowa domena białka NS3 tworzą proteinazę NS2-3, która autokatalitycznie hydrolizuje połączenie NS2 z NS3 [32]. Proteinaza NS2-3 jest prawdopodobnie metaloproteinazą, gdyż jej aktywność zwiększa się pod wpływem $ZnCl_2$ natomiast hamowana jest przez EDTA [33]. Niezbędne dla zachowania aktywności enzymatycznej tej proteinazy są położone w rejonie NS2: histydyna (pozycja 952) oraz cysteina (pozycja 993), które odpowiedzialne są za kompleksowanie jonów cynku [33].

NS3

Białko NS3 jest wielofunkcyjnym białkiem o masie 70 kD. Zawiera ono na swoim N-końcu aktywność proteinazy typu serynowego i odpowiedzialne jest za trawienie NS3/4A, NS4A/B, NS4B/5A. Niezależnie od tej aktywności aminoterminalna domena NS3 stanowi integralną część wspomnianej metaloproteinazy NS2-3 [33]. W C-końcowej części białko NS3 wykazuje aktywność NTP-azy/ RNA helikazy niezbędną do procesu translacji oraz replikacji genu HCV [65,66].

Potwierdzono występowanie w N-terminalnej części NS3 motywu sekwencyjnego charakterystycznego dla proteaz serynowych oraz sekwencji charakterystycznej dla nukleozydotrifosfatazy i helikazy w C-końcowej części tego białka.

Mimo częściowego nakładania się sekwencji proteinazy NS2-3 i NS3, aktywności enzymatyczne obu proteinaz są niezależne od siebie. Mutacje inaktywujące proteinazę NS2-3 nie mają wpływu na hydrolizę zależną od proteinazy NS3. Z drugiej strony inaktywacja NS3 nie ma wpływu na usunięcie wiązania peptydowego pomiędzy białkiem NS2 i NS3, które katalizowane jest przez proteinazę NS2-3 [32,33]. Do hydrolitycznego działania proteinazy na złącze NS3/4A i NS4B/5A niezbędna jest obecność białka NS4A, która ma również wpływ na szybkość trawienia w miejscu NS5A/5B [67]. Utworzenie stabilnego kompleksu pomiędzy NS3 i NS4A jest niezbędne do

uzyskania aktywności proteazy. Analiza struktury krystalicznej proteazy serynowej NS3 wykazała, że jest ona zbudowana podobnie do trypsyny i posiada strukturalne miejsce wiążące cynk [68].

Struktura C-końcowej części białka, a dokładniej domena bogata w argininę, umożliwia rozpoznanie 3' końca pojedynczej nici wirusowego RNA [69]. Białko NS3 wiąże się z 3' końcem pojedynczej nici RNA i powoduje rozwinięcie podwójnej nici RNA w kierunku od 3' do 5' [69]. Analiza struktury krystalicznej helikazy NS3 wskazuje na występowanie odrębnej domeny NTPazy i domeny wiążącej RNA [70].

Jak wykazano białko NS3 hamuje transformację komórek wywoływaną przez kinazę A [71], co może mieć bezpośredni wpływ na funkcje życiowe komórek docelowych.

Zaobserwowano, że proteazy komórkowe powodują powstawanie dwóch białek NS3A (49 kD) oraz NS3B (23 kD) [72]. Nie wiadomo jednak, jakie znaczenie biologiczne ma ta wewnętrzna hydroliza białka NS3.

NS4

Białko NS4A składa się z 54 aa (8kD) i jak wspomniano odgrywa istotną rolę jako kofaktor serynowej proteiny NS3. NS4A jest również związane z NS5A i pełni ważną rolę w procesie hiperfosforylacji białka NS5A [73]. Białko NS4B o masie cząsteczkowej 27 kD jest białkiem o charakterze hydrofobowym, o nie poznanej jeszcze funkcji.

NS5

Białko NS5A jest ufosforylowanym białkiem o masie 56 kD i występuje również w postaci hiperfosforylowanej (58 kD). Fosforylacja następuje przy reszcie serynowej poprzez działanie kinazy serynowo-treoninowej [74]. Analiza wykazała, że w procesie hiperfosforylacji istotne znaczenie mają reszty seryny w pozycjach 2197, 2201, 2204. Poziom fosforylacji w różnych izolatach HCV zależy od oddziaływania pomiędzy NS4A i NS5A [73].

Białko NS5A jest odpowiedzialne za pośrednio za skuteczność antywirusowego działania IFN- α [75]. Jak wykazano na podstawie analizy sekwencji genomów HCV izolowanych z surowic pacjentów odpornych i wrażliwych na działanie interferonu [76], rejon determinujący wrażliwość na interferon, określanymi skrótem ISDR (ang. IFN *sensitivity-determining region*), znajduje się w C-końcowej części NS5A pomiędzy aminokwasami 2209 i 2248. W komórkach zakażonych liniami HCV opornymi na

działanie IFN, wirusowe białko NS5A wchodzi w interakcję z indukowaną przez IFN kinazą białkową [75]. Przyłączenie NS5A uniemożliwia dimeryzację kinazy białkowej, co powoduje represję jej funkcji i w tym zahamowanie fosforylacji czynnika eIF-2 α . W przypadku linii HCV wrażliwych na działanie IFN, indukowana przez IFN kinaza białkowa nie wchodzi w interakcję z białkiem NS5A przez co dochodzi do fosforylacji czynnika eIF-2 α i zablokowania translacji. Inaktywacja kinazy białkowej przez interakcję z wirusowym białkiem NS5A czy też wspomnianym wcześniej białkiem E2 może być jednym z mechanizmów, dzięki którym HCV unika aktywnego działania IFN.

Białko NS5B zostało zidentyfikowane jako RNA-zależna RNA polimeraza [77]. NS5B jest białkiem o silnie konserwowanej sekwencji wśród różnych izolatów HCV. Jest to fosfoproteina o masie 65 kD związana z błonami. Białko NS5B uzyskane dzięki ekspresji *in vitro* w komórkach owadzych wykazuje zdolność transkrypcji całego RNA wirusowego bez dodatku innych białek pochodzących z HCV [78,79]. Wirusowa RNA polimeraza zależna od RNA odgrywa kluczową rolę w cyklu życiowym HCV jako enzym odpowiedzialny za replikację wirusa.

VI. Podsumowanie

Wirus zapalenia wątroby typu C stał się obiektem intensywnych badań z wielu powodów. Po pierwsze wzrasta wciąż liczba nosicieli HCV, która szacowana jest obecnie na około 170 milionów. Po drugie ponad 50% zakażonych nie eliminuje wirusa, co prowadzi do rozwoju zakażenia o charakterze przewlekłym a następnie do marskości i pierwotnego raka wątroby. Po trzecie, najlepsza dostępna obecnie terapia anty-HCV, tj. interferon podawany z analogiem guanozyny — ribawiryną, jest skuteczna tylko u 40% pacjentów. Wszystko to wskazuje na pilną potrzebę lepszego poznania biologii molekularnej HCV, co ułatwi opracowanie skuteczniejszej terapii antywirusowej.

Od sklonowania genomu HCV upłynęło ponad 10 lat, w ciągu których wiedza o białkach wirusowych oraz systemach uczestniczących w procesie dojrzewania tych białek znacznie wzrosła. Stało się tak głównie dzięki analizie wyników dotyczących białek wirusowych uzyskanych w różnych systemach ekspresji oraz analizie białek pochodzących od blisko spokrewnionych flawi- i pestiwirusów. Poznanie funkcji i określenie roli poszczególnych białek w cyklu życiowym wirusa ma ogromne perspektywy praktyczne. Mechanizm dojrzewania białek HCV i

skomplikowany układ wzajemnych zależności pomiędzy białkami, stanowi doskonały cel do rozwoju nowych strategii antywirusowych.

Podziękowania

Praca powstała w oparciu o temat statutowy Zakładu Biochemii nr 503-104-1.

Artykuł otrzymano 12 lipca 2001

Zaakceptowano do druku 12 marca 2002

Piśmiennictwo

1. Feinstone SM, Kapikian AZ, Purcell RH, Alter HJ, Holland PV (1975) *N Engl J Med* **292** (15): 767-767
2. Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, Houghton M (1989) *Science* **244** (4902): 359-62
3. Kuo G, Choo QL, Alter HJ, Gitnick GL, Redeker AG, Purcell RH, Miyamura T, Dienstag JL, Alter MJ, Stevens CE, et al. (1989) *Science* **244** (4902): 362-364
4. Chen PJ, Lin MH, Tai KF, Liu PC, Lin CJ, Chen DS (1992) *Virology* **188** (1): 102-113
5. Choo QL, Richman KH, Han JH, Berger K, Lee C, Dong C, Gallegos C, Coit D, Medina Selby R, Barr PJ, et al. (1991) *Proc Natl Acad Sci U S A* **88** (6): 2451-2455
6. Okamoto H, Okada S, Sugiyama Y, Kurai K, Iizuka H, Machida A, Miyakawa Y, Mayumi M (1991) *J Gen Virol* **72** (Pt 11): 2697-2704
7. Bradley DW, McCaustland KA, Cook EH, Schable CA, Ebert JW, Maynard JE (1985) *Gastroenterology* **88** (3): 773-779
8. Chambers TJ, Hahn CS, Galler R, Rice CM (1990) *Annu Rev Microbiol* **44**: 649-688
9. Collett MS (1992) *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* **15** (3): 145-154
10. Miller RH, Purcell RH (1990) *Proc Natl Acad Sci U S A* **87** (6): 2057-2061
11. Houghton M, Weiner A, Han J, Kuo G, Choo QL (1991) *Hepatology* **14**: 381-388
12. Weiner AJ, Kuo G, Bradley DW, Bonino F, Saracco G, Lee C, Rosenblatt J, Choo QL, Houghton M (1990) *Lancet* **335** (8680): 1-3
13. Shindo M, Di Bisceglie AM, Akatsuka T, Fong TL, Scaglione L, Donets M, Hoofnagle JH, Feinstone SM (1994) *Proc Natl Acad Sci U S A* **91** (18): 8719-8723
14. Tsukiyama Kohara K, Iizuka N, Kohara M, Nomoto A (1992) *J Virol* **66** (3): 1476-1483
15. Wang C, Sarnow P, Siddiqui A (1993) *J Virol* **67** (6): 3338-3344
16. Ali N, Siddiqui A (1997) *Proc Natl Acad Sci U S A* **94** (6): 2249-2254
17. Ali N, Siddiqui A (1995) *J Virol* **69** (10): 6367-6375
18. Hahm B, Kim YK, Kim JH, Kim TY, Jang SK (1998) *J Virol* **72** (11): 8782-8788
19. Han JH, Houghton M (1992) *Nucleic Acids Res* **20** (13): 3520
20. Blight KJ, Rice CM (1997) *J Virol* **71** (10): 7345-7352
21. Ito T, Tahara SM, Lai MM (1998) *J Virol* **72** (11): 8789-8796
22. Pestova S, Shatsky, Fletcher, Jackson, Hellen (1998) *Genes Dev* **12** (1): 67-83
23. Honda, Kaneko, Matsushita, Kobayashi, Abell, Lemon (2000) *Gastroenterology* **118** (1): 152-162
24. Lohmann V, Koch JO, Bartenschlager R (1996) *J Hepatol* **24** (2 Suppl): 11-19
25. Suzuki R, Suzuki T, Ishii K, Matsuura Y, Miyamura T (1999) *Intervirology* **42** (2-3): 145-152
26. Grakoui A, Wychowski C, Lin C, Feinstone SM, Rice CM (1993) *J Virol* **67** (3): 1385-1395
27. Hijikata M, Kato N, Ootsuyama Y, Nakagawa M, Shimotohno K (1991) *Proc Natl Acad Sci U S A* **88** (13): 5547-5551
28. Santolini E, Migliaccio G, La Monica N (1994) *J Virol* **68** (6): 3631-3641
29. Selby MJ, Glazer E, Masiarz F, Houghton M (1994) *Virology* **204** (1): 114-122
30. Lin C, Lindenbach BD, Pragai BM, McCourt DW, Rice CM (1994) *J Virol* **68** (8): 5063-5073
31. Dubuisson J, Hsu HH, Cheung RC, Greenberg HB, Russell DG, Rice CM (1994) *J Virol* **68** (10): 6147-6160
32. Grakoui A, McCourt DW, Wychowski C, Feinstone SM, Rice CM (1993) *Proc Natl Acad Sci U S A* **90** (22): 10583-10587
33. Hijikata M, Mizushima H, Akagi T, Mori S, Kakiuchi N, Kato N, Tanaka T, Kimura K, Shimotohno K (1993) *J Virol* **67** (8): 4665-4675
34. Lo SY, Selby M, Tong M, Ou JH (1994) *Virology* **199** (1): 124-131
35. Liu Q, Tackney C, Bhat RA, Prince AM, Zhang P (1997) *J Virol* **71** (1): 657-662
36. Yasui K, Wakita T, Tsukiyama Kohara K, Funahashi SI, Ichikawa M, Kajita T, Moradpour D, Wands JR, Kohara M (1998) *J Virol* **72** (7): 6048-6055
37. Chang SC, Yen JH, Kang HY, Jang MH, Chang MF (1994) *Biochem Biophys Res Commun* **205** (2): 1284-1290
38. Lo SY, Selby MJ, Ou JH (1996) *J Virol* **70** (8): 5177-5182
39. Zhu N, Khoshnan A, Schneider R, Matsumoto M, Dennert G, Ware C, Lai MM (1998) *J Virol* **72** (5): 3691-3697
40. Chen CM, You LR, Hwang LH, Lee YH (1997) *J Virol* **71** (12): 9417-26
41. Ray RB, Meyer K, Ray R (1996) *Virology* **226** (2): 176-182
42. Ruggieri A, Harada T, Matsuura Y, Miyamura T (1997) *Virology* **229** (1): 68-76
43. Kim DW, Suzuki R, Harada T, Saito I, Miyamura T (1994) *Jpn J Med Sci Biol* **47** (4): 211-220
44. Ray RB, Lagging LM, Meyer K, Steele R, Ray R (1995) *Virus Res* **37** (3): 209-220
45. Ray RB, Steele R, Meyer K, Ray R (1997) *J Biol Chem* **272** (17): 10983-10986
46. Shih CM, Lo SJ, Miyamura T, Chen SY, Lee YH (1993) *J Virol* **67**: 5823-5832
47. Moriya K, Yotsuyanagi H, Shintani Y, Fujie H, Ishibashi K, Matsuura Y, Miyamura T, Koike K (1997) *J Gen Virol* **78** (Pt 7): 1527-1531
48. Moriya K, Fujie H, Shintani Y, Yotsuyanagi H, Matsuura Y, Tsutsumi T, Ishibashi K, Kimura K, Miyamura, Koike K (1998) *Nature Medicine* **4**: 1065-1067
49. Ray RB, Meyer K, Ray R (2000) *Virology* **271** (1): 197-204
50. Mizushima H, Hijikata M, Asabe S, Hirota M, Kimura K, Shimotohno K (1994) *J Virol* **68** (10): 6215-6222
51. Miyamura T, Matsuura Y (1993) *Trends Microbiol* **1** (6): 229-231
52. Kato N, Ootsuyama Y, Ohkoshi S, Nakazawa T, Sekiya H, Hijikata M, Shimotohno K (1992) *Biochem Biophys Res Commun* **189** (1): 119-127
53. Zibert A, Schreier E, Roggendorf M (1995) *Virology* **208** (2): 653-661
54. Shimizu YK, Igarashi H, Kiyohara T, Cabezon T, Farci P, Purcell RH, Yoshikura H (1996) *Virology* **223** (2): 409-412
55. Farci P, Shimoda A, Wong D, Cabezon T, De Gioannis D, Strazzer A, Shimizu Y, Shapiro M, Alter HJ, Purcell RH (1996) *Proc Natl Acad Sci U S A* **93** (26): 15394-15399

56. Taylor DR, Shi ST, Romano PR, Barber GN, Lai MM (1999) *Science* **285** (5424): 107-110
57. Flint M, Thomas JM, Maidens CM, Shotton C, Levy S, Barclay WS, McKeating JA (1999) *J Virol* **73** (8): 6782-6790
58. Pileri P, Uematsu Y, Campagnoli S, Galli G, Falugi F, Petracca R, Weiner AJ, Houghton M, Rosa D, Grandi G, et al. (1998) *Science* **282** (5390): 938-941
59. Agnello V, Abel G, Elfahal M, Knight GB, Zhang QX (1999) *Proc Natl Acad Sci U S A* **96** (22): 12766-12771
60. Thomssen R, Bonk S, Propfe C, Heermann KH, Kochel HG, Uy A (1992) *Med Microbiol Immunol Berl* **181** (5): 293-300
61. Monazahian M, Bohme I, Bonk S, Koch A, Scholz C, Grethe S, Thomssen R (1999) *J Med Virol* **57** (3): 223-229
62. *International Symposium on Viral Hepatitis and Liver Disease*, Atlanta. [Abstract] Abstract Book 2000:68-70
63. Lohmann V, Korner F, Koch J, Herian U, Theilmann L, Bartenschlager R (1999) *Science* **285** (5424): 110-113
64. Santolini E, Pacini L, Fipaldini C, Migliaccio G, Monica N (1995) *J Virol* **69** (12): 7461-7471
65. Bartenschlager R, Ahlborn Laake L, Mous J, Jacobsen H (1993) *J Virol* **67** (7): 3835-3844
66. Kolykhalov AA, Mihalik K, Feinstone SM, Rice CM (2000) *J Virol* **74** (4): 2046-2051
67. Failla C, Tomei L, De Francesco R (1994) *J Virol* **68** (6): 3753-3760
68. Love RA, Parge HE, Wickersham JA, Hostomsky Z, Habuka N, Moomaw EW, Adachi T, Hostomska Z (1996) *Cell* **87** (2): 331-342
69. Tai, Chi, Chen, Hwang (1996) *J Virol* **70** (12): 8477-8484
70. Yao, Hesson, Cable, Hong, Kwong, Le, Weber (1997) *Nat Struct Biol* **4** (6): 463-467
71. Borowski, Heiland, Oehlmann, Becker, Kornetzky, Feucht, Laufs (1996) *Eur J Biochem* **237** (3): 611-618
72. Shoji I, Suzuki T, Sato M, Aizaki H, Chiba T, Matsuura Y, Miyamura T (1999) *Virology* **254** (2): 315-3123
73. Asabe SI, Tanji Y, Satoh S, Kaneko T, Kimura K, Shimotohno K (1997) *J Virol* **71** (1): 790-796
74. Reed KE, Gorbalenya AE, Rice CM (1998) *J Virol* **72** (7): 6199-6206
75. Gale M, Jr., Blakely CM, Kwieciszewski B, Tan SL, Dossett M, Tang NM, Korth MJ, Polyak SJ, Gretch DR, Katze MG (1998) *Mol Cell Biol* **18** (9): 5208-5218
76. Enomoto N, Sakuma I, Asahina Y, Kurosaki M, Murakami T, Yamamoto C, Izumi N, Marumo F, Sato C (1995) *J Clin Invest* **96** (1): 224-230
77. Behrens SE, Tomei L, De Francesco R (1996) *EMBO J* **15** (1): 12-22
78. Lohmann V, Korner F, Herian U, Bartenschlager R (1997) *J Virol* **71** (11): 8416-28
79. Ishii, Tanaka, Yap, Aizaki, Matsuura, Miyamura (1999) *Hepatology* **29** (4): 1227-35

Sprawozdanie z XXXVII Zjazdu Polskiego Towarzystwa Biochemicznego

Toruń, 10-14 września 2001

W dniach 12-14 września 2001 obradował w Toruniu XXXVII Zjazd Polskiego Towarzystwa Biochemicznego.

Patronat honorowy nad Zjazdem objęli: Minister Nauki, Przewodniczący Komitetu Badań Naukowych prof. dr hab. Andrzej Wiszniewski, Prezes Polskiej Akademii Nauk prof. dr hab. Mirosław Mossakowski, Dyrektor Instytutu Biologii Doświadczalnej PAN im. M. Nenckiego prof. dr hab. Maciej J. Nałęcz, Wojewoda Kujawsko-Pomorski Józef Rogacki, Marszałek Województwa Kujawsko-Pomorskiego Waldemar Achramowicz, Prezydent Miasta Torunia Wojciech Grochowski oraz rektorzy uczelni toruńskich i bydgoskich.

W Zjeździe uczestniczyło blisko 700 osób z kraju, Francji, Holandii i USA oraz biochemicy pochodzenia polskiego z Białorusi, których pobyt na Zjeździe był finansowany przez Stowarzyszenie Wspólnota Polska oraz Komitet Organizacyjny Zjazdu.

Uroczysta inauguracja Zjazdu odbyła się w Auli Uniwersytetu M. Kopernika. Gości powitał Przewodniczący Komitetu Organizacyjnego prof. dr hab. Michał Komoszyński. Gospodarz Uniwersytetu Mikołaja Kopernika Jego Magnificencja Rektor prof. dr hab. Jan Kopcewicz w krótkim wystąpieniu przywitał zebranych oraz podkreślił znaczenie biochemii w nowoczesnych naukach biologicznych. Następnie przedstawiciele władz wojewódzkich i miejskich oraz rektorzy bydgoskich uczelni wygłosili adresy powitalne. W kolejnym punkcie inauguracji Prezes Polskiego Towarzystwa Biochemicznego prof. dr hab. Jolanta Barańska przedstawiła osiągnięcia Towarzystwa w upływającym roku oraz wręczyła następujące nagrody:

1. W Konkursie im. Bronisława Filipowicza za popularyzację biochemii — prof. dr hab. Magdalenie Fikus za publikacje popularno-naukowe i organizację Festiwalu Nauki, zaś wyróżnienie przypadło prof. dr hab. Aleksandrze Kubicz za książkę „Tajemnice ewolucji molekularnej”, PWN, 1999,

2. Im. Jakuba Karola Parnasa za najlepszą pracę doświadczalną z zakresu biochemii wykonaną w pracowni na terenie Polski — zespołowi prof. dr hab. Jacka Otlewskiego za cykl prac:

„Determination of a high precision structure of a novel protein, *Linum usitatissimum* trypsin inhibitor (LUTI), using computer-aided assignment of NOESY cross-peaks”.

J. Mol. Biol. (2000) 302: 1179-1192, „NMR solution structure of *Apis mellifera* chymotrypsin/cathepsin G inhibitor-1 (AMCI-1): structural similarity with *Ascaris* protease inhibitors”. *Protein Sci.* (2000) 9: 976-984, „Inhibition of six serine proteinases of the human coagulation system by mutants of bovine pancreatic trypsin inhibitor”. *J. Biol. Chem.* (2000) 275: 33346-33352

3. Im. Bolesława Skarżyńskiego za najlepszą publikację w 2000 roku w „Postęпах Biochemii” — dr Iwone Grądzkiej za pracę: „Apoptoza: decyzja należy do mitochondrium” *Postępy Biochemii* 2000 (1) 2-16.

Nagrodę za najlepszą pracę z chemii i biochemii kwasów nukleinowych przyznawaną przez Sekcję Kwasów Nukleinowych Zarządu Głównego PTBioch i firmę Sigma Aldrich otrzymał dr Janusz M. Bujnicki za pracę: „Phylogenomic analysis of 16S rRNA: (guanine-N2) methyltransferases suggests new family members and reveals highly conserved motifs and a domain structure similar to other nucleic acid amino-methyltransferases”. *FASEB J.* 2000 14, 2365-2368.

Nagrodę wręczył pan dr Maciej Marlewski — przedstawiciel Sigma-Aldrich.

Część naukową zjazdu zainaugurował wykład prof. dr hab. Mariusza Jaskólskiego „Wymiana domen strukturalnych jako mechanizm oligomeryzacji białek”, w którym w ciekawy sposób przedstawiono najnowsze poglądy na molekularne mechanizmy procesów związanych z patologią konformacyjną białek. Koncert muzyki kameralnej sponsorowany przez firmę Applied Biosystems oraz lampka wina z przekąskami ufundowane przez innych sponsorów zakończyły inaugurację Zjazdu.

Obrady Zjazdu odbywały się w miasteczku uniwersyteckim na Bielanach przez trzy dni robocze. Na program Zjazdu złożyło się 14 sesji naukowych poświęconych następującym zagadnieniom:

Mechanizmy różnicowania komórek

Molekularne mechanizmy nowotworzenia

Uszkodzenia i naprawa DNA
Puryny i pirymidyny w transmisji informacji
Receptory i transmisja sygnałów w komórkach roślinnych
Steroidy w regulacji niektórych szlaków metabolicznych
Rola struktury w aktywności białek
Biochemia w obronie środowiska
Agrobiotechnologia
Mięśnie — metabolizm, defekty genetyczne
Diagnostyka molekularna w identyfikacji różnicowania genetycznego
Dydaktyka biochemii
Doniesienia różne

- a. kwasy nukleinowe
- b. enzymy
- c. receptory i błony
- d. inne

W czasie obrad wygłoszono 63 wykłady, 147 komunikatów ustnych i zaprezentowano 273 plakaty. Prezentowane na Zjeździe wyniki badań opublikowano w Streszczeniach. Innymi wydawnictwami Zjazdu były dwa komunikaty oraz obszerny Program Zjazdu.

Sesji „Agrobiotechnologia” towarzyszyły zorganizowane przez Biuro Informacyjne Żywności Genetycznie Modyfikowanej GMO we współpracy z Sekretariatem Zjazdu warsztaty dziennikarskie oraz młodzieżowe forum biotechnologii. Wzięło w nim udział około 15 dziennikarzy i 150 licealistów. Inicjatorem i animatorem tych spotkań był prof. dr hab. Tomasz Twardowski.

W trakcie obrad odbywały się wykłady sponsorowane firm Merck/Novagen i Quiagen, a także prezentacja firmy Applied Biosystems. W przerwach obrad była możliwość zapoznania się z ofertami firm, zwiedzania Torunia, wysłuchania koncertu organowego czy udziału w spotkaniu towarzyskim, a po zakończeniu Zjazdu w wycieczkach i ognisku zorganizowanym poza Toruniem.

Podczas Zjazdu odbyło się Walne Zebranie członków PTBioch, na którym Prezes Towarzystwa prof. dr hab. Jolanta Barańska omówiła dokonania Zarządu w upływającej trzyletniej kadencji oraz wybrano nowe władze Towarzystwa. W wyniku głosowania prof. dr hab. Jolantę Barańską wybrano Prezesem Towarzystwa, a wiceprezesem prof. dr hab. Lilianę Konarską, zaś członkami Zarządu zostali koledzy: Adam Szewczyk, Teresa Wesołowska, Marek Gniazdowski, Edward Bańkowski, Michał Komoszyński, Anna Dygas, Maria Malicka-Błaszkiwicz, Michał Woźniak, Jerzy Duszyński, Artur Jarmołowski, Iwona Żak, Teresa Jakubowicz, Tomasz Twardowski, Dariusz Chlubek. Do Komisji Rewizyjnej wybrano kolegów: Martę Stryjecką-Zimmer, Barbarę Grzelakowską-Sztabert oraz Zofię Szweykowską. Ważnym punktem Walnego Zebrania było uchwalenie rezolucji krytykującej przyjętą przez Sejm RP ustawę o Organizmach Genetycznie Modyfikowanych (GMO).

Na spotkaniu kończącym Zjazd ogłoszono wyniki konkursów o nagrodę im. Janiny Opieńskiej-Blauth dla studentów za szczególnie wartościowe prace badawcze zgłoszone i przedstawione na dorocznym Zjeździe PTBioch. oraz o nagrodę im. Włodzimierza Mozołowskiego dla młodych biochemików. Komisjom konkursowym przewodniczyły prof. dr hab. Marta Stryjecka-Zimmer i prof. dr hab. Jadwiga Gniot-Szulżycka.

W pierwszym Konkursie nagrodę otrzymali J. Kobiela i J. Krajewski za pracę „Mikrosomalna 4-hydroksylaza estradiolu jako enzym odpowiedzialny za powstawanie stresu oksydacyjnego w eksperymentalnym nowotworze nerki”, a wyróżnienie przyznano J. Gołębiewskiej i P. Rozwadowskiemu za pracę „Apoptoza i aktywność kaspazy-3 w komórkach osteosarcoma traktowanych 2-metyloestradiolem”, R. Dutkiewicz i A. Czyż za pracę „Rola genu yhbz bakterii *E. coli*”.

W konkursie im. Włodzimierz Mozołowskiego przyznano nagrodę Jolancie Wiejak za pracę „Homolog ssaczej dynaminy u *Paramecium*: klonowanie i sekwencjonowanie katalitycznej domeny GTP-azowej” oraz wyróżnienie Anecie Kirilenko za pracę „Aneksyna VI jako kanał jonowy indukowany przez GTP — charakterystyka oddziaływań pomiędzy nukleotydem a białkiem”, Filipowi Kukulskiemu za pracę „E-NTPDaza 1 (e-apiraza) i E-NTPDaza 2 (e-ATPaza) synaptosomów kory mózgu wieprzowego”, Mariuszowi Mucha za pracę „Lokalizacja mejotycznych pęknięć w sztucznych chromosomach drożdży”, Dorocie Pięknjej za pracę „Ekspresja podjednostki PSST kompleksu I zachodzi w łubinie co najmniej z trzech genów”, Monice

Sakowicz za pracę „Adenozyna i transportery nukleozydowe w cukrzycy”, Sławomirowi Wisniewskiemu za pracę „Mutacje czterech różnych genów ujawniają nową ścieżkę sygnałową uczestniczącą w różnicowaniu przydatków skóry”.

Poziom naukowy Zjazd, według zgodnej opinii uczestników, był wysoki, a obrady przebiegały w miłej atmosferze. Ogromna w tym zasługa Komitetu Naukowego Zjazdu oraz członków i sympatyków Toruńskiego Oddziału Polskiego Towarzystwa Biochemicznego.

Kończąc to sprawozdanie dziękuję wszystkim kolegom i koleżankom z Instytutu Biologii Ogólnej i Molekularnej UMK w Toruniu oraz Zakładów Biochemii Akademii Medycznej i Akademii Rolniczo-Technicznej w Bydgoszczy za pracę, odpowiedzialność i życzliwość, jaką wykazali podczas spotkania polskich biochemików w Toruniu.

Chciałbym również przekazać podziękowania sponsorom, a w szczególności firmom Sigma Aldrich, Merck, ICN Biomedicals oraz Applied Biosystems, których pomoc uświetniła toruński Zjazd.

Michał Komoszyński

KOMUNIKAT

23 - 25 września 2002 we Wrocławiu odbędzie się **VIII Konferencja Biologii Komórki**, więcej informacji www.ibmb.uni.wroc.pl/cellbiol/

WALNE ZEBRANIE POLSKIEGO TOWARZYSTWA BIOCHEMICZNEGO TORUŃ, 13 WRZEŚNIA 2001 R.

REZOLUCJA

Uchwalenie ustawy z dnia 22 czerwca 2001 r. o organizmach genetycznie zmodyfikowanych (GMO) (Dz. U. z 25 lipca 2001 r., nr 76, poz. 811) miało regulować w sposób kompleksowy zasady pracy w zakresie inżynierii genetycznej i nowoczesnej biotechnologii, miało też być zasadniczym krokiem w kierunku zbliżenia naszej legislacji ze standardami Unii Europejskiej.

Z całym naciskiem wyrażamy pogląd, że polskie prawo w tym zakresie winno:

- 1) sprzyjać rozwojowi krajowej nauki i edukacji,
- 2) wspierać transfer technologii ze środowisk naukowych do przemysłu i
- 3) promować rozwój rodzimej gospodarki.

Jesteśmy przekonani, że ustawa z 22 czerwca 2001 r. nie spełnia tych warunków. Na odwrót, jej przestrzeganie całkowicie zahamuje rozwój badań i ich wdrożenie w zakresie biologii, w szczególności biologii molekularnej i biotechnologii. W skali całego kraju ustawa stawia poza nawias społeczny tysiące studentów i pracowników naukowych, którzy tracą możliwość edukacji na współczesnym poziomie i skutecznego prowadzenia badań naukowych oraz badawczo-wdrożeniowych.

Ustawa wymusi całkowitą zmianę programów kształcenia w wyższych uczelniach, uniwersytetach, akademiach medycznych, uczelniach technicznych i rolniczych, czyniąc programy nauczania przestarzałymi i w związku z tym nieatrakcyjnymi. Obawiamy się, że ustawa odwróci zainteresowanie młodzieży od najistotniejszych światowych nurtów rozwoju nauki i będzie powodem dalszej emigracji najzdolniejszych ludzi z Polski.

Z całą pewnością ustawa spowoduje małą atrakcyjność Polski dla czołowych firm biotechnologicznych, gdyż praktycznie uniemożliwia szybkie prowadzenie badań, a także spowoduje konieczność skierowania części, i tak skromnych, środków przeznaczonych na naukę na opłacenie zezwoleń, kaucji i ubezpieczeń.

Uważamy, że rozporządzenia wykonawcze winny być opracowane we właściwym terminie, nie powodując zakłóceń w procesie naukowym i dydaktycznym, jak również w rozwoju przemysłu i tworzeniu nowych miejsc pracy.

Jesteśmy przekonani, że istnieje konieczność nowelizacji ustawy o GMO w zakresie jej stosowania w odniesieniu do zagadnień naukowych przy pracy z GMO grupy I (o najmniejszej szkodliwości) – w pełni wystarczające jest zawiadomienie i rejestracja, a nie zezwolenie. Uważamy także, że konieczne jest zwolnienie placówek dydaktycznych i badawczych z opłat z tytułu wnioskowania o zezwolenie. Winien również ulec zmianie restrykcyjny ton i charakter zapisu.

Oczekujemy, że polskie normy prawne będą nie tylko zgodne ze standardem Unii Europejskiej, ale będą wspierać rozwój potencjału naukowego i gospodarczego naszego kraju.

**IGR
PAN**

**Krajowa Nagroda Naukowa
z Zakresu Genetyki Roślin
im. Stefana Barbackiego**

2001

Rada Naukowa Instytutu Genetyki Roślin PAN w Poznaniu ustanowiła Krajową Nagrodę Naukową z Zakresu Genetyki Roślin im. Stefana Barbackiego.

Ideą nagrody jest wyróżnianie młodych naukowców zajmujących się genetyką roślin i promowanie osiągnięć, będących rezultatem badań prowadzonych w krajowych laboratoriach.

Nagroda przyznawana jest od 1994 roku corocznie, przez Kapitułę Nagrody, za oryginalne prace badawcze udokumentowane publikacją w krajowym lub zagranicznym czasopiśmie w okresie ostatnich trzech lat, dotychczas nienagradzane.

**W roku 2001 nagrodę I stopnia otrzymał
— dr ROBERT HASTEROK**

(Katedra Anatomii i Cytologii Roślin Uniwersytetu Śląskiego, Katowice)

za: „**Badania z zakresu cytogenetyki wybranych gatunków z rodzaju *Brassica***”

Sponsorami funduszu nagród byli: Agencja Własności Rolnej Skarbu Państwa — Warszawa, Dom Handlowy Nauki — Poznań, PlaniCo Hodowla i Nasiennictwo Ogrodnicze w Świętosławiu — Kruszyn, Poznańska Hodowla Roślin — Tulce k. Poznania, Hodowla i Nasiennictwo Ogrodnicze Nochowo — Śrem

FOR SALE

MegaBACE 1000's: \$70,000

ABI 377's: \$25,000

www.amebioscience.com

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. Istnieje możliwość 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 arabskiej, wzory zaś rzymskie. Na marginesie tekstu należy zaznaczyć ółwkiem 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” (ółwkiem, 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 przesać 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 2002 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. W polu „subject „, umieść swoje nazwisko i imię (w takiej kolejności i bez polskich znaków diakrytycznych) oraz adres e-mailu. 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 Adam Szewczyk, 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)

Adam Szewczyk

Sekretarz Zarządu Głównego
Polskiego Towarzystwa Biochemicznego