

Przusi db  
PL ISSN 0324-833X

POLSKIE  
TOWARZYSTWO  
ANATOMICZNE

**TOM 17-NR 2'90**  
(97-196)

# Postępy Biologii Komórki

WYDAWNICTWO SGGW  
FUNDACJA • ROZWÓJ SGGW-AR •

<http://rcin.org.pl>

Kwartalnik Polskiego Towarzystwa Anatomicznego wydawany z pomocą finansową Polskiej Akademii Nauk

Redaguje Kolegium:

Szczepan BILIŃSKI, Jerzy KAWIAK, Maciej KAWALEC, Wicenty KILARSKI, Jan MICHEJDA, Maria OLSZEWSKA, Maciej ZABEL

Rada Redakcyjna:

Zofia OSUCHOWSKA – przewodnicząca, Mieczysław CHORAŻY, Leszek CIECIURA, Antoni HORST, Aleksander KOJ, Włodzimierz KOROHODA, Leszek KUŹNICKI, Olgierd NARKIEWICZ, Aleksandra PRZEŁĘCKA, Aleksandra STOJAŁOWSKA, Lech WOJTCZAK

*Adres Redakcji: Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego ul. Marymoncka 99, 01-813 Warszawa*

## Do Czytelników i Autorów POSTĘPÓW BIOLOGII KOMÓRKI

POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI ostatnio ukazują się z dużym opóźnieniem, co jednak powinno się poprawić. Bardzo zależy nam na wspólnym z Czytelnikami i Autorami redagowaniu czasopisma – mamy ambicje łącznika. Prosimy więc o listy do redakcji uzupełniające wiadomości zawarte w publikowanych artykułach oraz krytyczne opinie naukowe, ale też opinie na temat organizacji naszego czasopisma. W nowych wskazówkach dla Autorów staramy się podkreślić znaczenie aktualności nadsyłanych informacji naukowych przedstawiając konieczność opierania nadsyłanych artykułów na najnowszej literaturze, której tak brakuje w kraju. Bardzo zależy nam na wspieraniu naszych działań przez Czytelników i Autorów, czego widocznym wyrazem będzie również prenumerata pisma.

*Warszawa, lipiec 1990*

*Redakcja*

**Wydawnictwo SGGW-AR, Fundacja •ROZWÓJ SGGW-AR•**

Nakład 500 + 30 egz. Ark. wyd. 9,5 Ark. druk. 6,25 Cena zł 30 000. Zam.

Oddano do składu 15.07.1990 r. Podpisano do druku w październiku 1990 r. Druk ukończono w listopadzie 1990 r.

## MECHANIZM DZIAŁANIA ACETYLOCHOLINY W ROŚLINACH\*

### MECHANISM OF ACTION OF ACETYLCHOLINE IN PLANTS

Andrzej TRETYN

Uniwersytet M. Kopernika, Instytut Biologii, Zakład Botaniki Ogólnej

*Streszczenie.* Egzogeniczna acetylocholina (*ACh*) wpływa na kontrolowany przez fitochrom wzrost i rozwój roślin. Naśladując działanie światła czerwonego (*R*) acetylocholina stymuluje przyleganie wierzchołków korzeni do powierzchni szkła, wpływa na ruchy liści oraz na przepuszczalność błon dla jonów. *ACh*, podobnie jak *R*, w środowisku zawierającym  $Ca^{2+}$ , stymuluje pęcznienie protoplastów izolowanych z etiolowanych liści pszenicy. Pęcznienie było także indukowane przez *ACh* w środowisku zawierającym  $K^+$  lub  $Na^+$ . Poza *ACh* tylko karbamylcholina, spośród przebadanych pochodnych cholicy, stymulowała badany proces. Muskaryna i nikotyna naśladowały działanie *ACh*. Z drugiej strony atropina i d-tubokuraryna hamowały indukowane *ACh* pęcznienie protoplastów. Jak w komórkach zwierzęcych, w protoplastach liści pszenicy działanie wrażliwych na muskarynę receptorów *ACh* (*mAChR*) wydaje się być zależne, natomiast wrażliwych na nikotynę (*nAChR*) niezależne od metabolizmu fosfatydylo-inozytoli. Podobieństwo pomiędzy oddziaływaniem *ACh* poprzez *mAChR* oraz *R* poprzez fitochrom na pęcznienie protoplastów sugeruje, że w obu przypadkach istnieje wspólny łańcuch transdukcji sygnału.

*Summary.* Exogenous acetylcholine (*ACh*) affects on phytochrome-controlled plant growth and development. Mimicking red light (*R*) *ACh* stimulates adhesion of root tips to glass surface, influences leaves movement and membrane permeability to ions. Similarly to *R* acetylcholine, in presence of  $Ca^{2+}$ , stimulates swelling of protoplast isolated from etiolated wheat leaves. Swelling of protoplasts was also induced by *ACh* in a medium containing  $K^+$  or  $Na^+$ . Besides *ACh*, only carbamylcholine out of the choline derivatives tested was active in induction of swelling. Muscarine and nicotine mimicked action of *ACh*. On the other hand, atropine and d-tubocurarine nullified *ACh*-induced swelling responses. It is proposed, that just as in the case in animal cells, muscarinesensitive *ACh* receptors (*mAChRs*) appear to be associated with a phosphatidyl-inositol-dependent pathway, whereas the nicotinesensitive ones (*nAChRs*) are phosphatidyl-inositol-independent. Similarity between the action of *ACh* via *mAChRs* and *R* via phytochrome in protoplast swelling suggests they share a common signal transduction pathway.

*Wykaz stosowanych skrótów.* *ACh* – acetylocholina; *AChE* – acetylocholinoesteraza; *AChR* – receptory acetylocholin; *nAChR* – receptory acetylocholin nikotynowe; *mAChR* – receptory acetylocholin muskarynowe; *ATCh* – acetylotransferaza cholinowa; *FR* – światło dalekiej czerwieni (730 nm); *P* – fitochrom; *R* – światło czerwone (660 nm); *BTx* –  $\alpha$ -bungarotoksyna.

\*Praca wykonana w ramach RP II 12.15.

## WSTĘP

Przed przystąpieniem do omówienia mechanizmu działania *ACh* w roślinach przytoczymy kilka podstawowych informacji dotyczących struktury i działania zwierzęcego systemu cholinergicznego. System ten występuje w nerwowych i nienerwowych komórkach i składa się z następujących elementów: 1° *ACh* i 2° jej receptorów (*AChR*) oraz 3° acetylocholinoesterazy (*AChE*) i 4° acetylotransferazy cholinowej (*ATCh*) [37,46].

1° *ACh* jest stosunkowo prostym związkiem organicznym, estrem czwartorzędowej aminy, choliny i kwasu octowego [58].

2° W komórkach zwierzęcych występują dwa typy *AChR*, tzw. nikotynowe (*nAChR*) i muskarynowe (*mAChR*) [5, 6, 43, 46]. Pierwszy z wymienionych typ receptorów poza *ACh* stymulowany jest przez nikotynę, drugi natomiast przez muskarynę. Związki te nazywane są agonistami *AChR*. Oprócz substancji o działaniu stymulacyjnym istnieją substancje hamujące aktywność *AChR*, tzw. antagoniści *ACh*, jak np. atropina (antagonista *mAChR*) i d-tubokuraryna (antagonista *nAChR*) [43].

3° *ATCh* jest enzymem uczestniczącym w syntezie *ACh*, z jej prekursorów choliny i acetylo-CoA [1, 6, 17, 58].

4° *AChE* rozkłada *ACh* do choliny i kwasu octowego [6, 8, 17, 40, 57].

W celu porównania poniżej przedstawiona zostanie charakterystyka tzw. roślinnego systemu cholinergicznego [37, 57, 58].

## METABOLIZM *ACh* W ROŚLINACH

*ACh* izolowana z materiału roślinnego ma właściwości identyczne jak substancja występująca w zakończeniach komórek nerwowych. U obu grup organizmów, tj. u zwierząt i roślin, podlega ona podobnym przemianom metabolicznym [58].

### SYNTEZA *ACh*

Prekursorami syntezy *ACh* są cholina i acetylo-CoA. Oba te związki uczestniczą w wielu przemianach metabolicznych u roślin i zwierząt. W ekstraktach hypokotyli fasoli stwierdzono występowanie aktywności kinazy cholinowej [EC 2.7.1.32], rybokinazy [EC 2.7.1.15] oraz fosfotransferazy cholinowej [EC 2.7.8.2] katalizujących przekształcanie choliny do fosfatydylocholiny [20, 22]. Hartmann [16] wykazał, że włączanie znakowanej choliny w cząsteczki *ACh* jest znacznie wolniejsze niż znakowanego octanu. Sześciodniowe etiolowane siewki fasoli włączały znakowany octan jedynie w trakcie naświetlania siewek *R*. Glukoza, stanowiąca dogodny prekursor do syntezy *ACh* u zwierząt, praktycznie nie była wykorzystywana do syntezy tego związku w tkankach siewek fasoli [16]. Może to sugerować, że podobnie jak w zakończeniach komórek nerwowych elektrycznego organu *Torpedo* również u fasoli do syntezy *ACh* pozyskiwana jest reszta octanowa. U *Torpedo* wykryto aktywność syntazy acetylo-CoA katalizującej przekształcanie octanu do acetylo-CoA [27]. Zarówno u zwierząt, jak i u roślin enzymem uczestniczącym w syntezie *ACh* jest *ATCh* [58]. Aktywność *ATCh* stwierdzono jak dotąd w tkankach *Urtica dioica* [1, 49], *Helianthus*

*annuus*, *Pisum sativum*, *Spinacia oleracea*, *Oscillatoria agardhi* [49], *Phaseolus vulgaris* [17] oraz nasionach *Allium altaicum* [12].

Nie ustalono ostatecznie subkomórkowego miejsca syntezy *ACh* w tkankach roślinnych. W wierzchołkach korzeni *Phaseolus aureus* synteza tego związku zachodzi przypuszczalnie w błonach retikulum endoplazmatycznego [30]. U *Phaseolus vulgaris* najwyższą aktywność *ATCh* wykryto w cytozolu (57% całkowitej aktywności), co może sugerować, że przynajmniej u tego gatunku fasoli, podobnie jak u zwierząt [27], synteza *ACh* zachodzi w cytozolu [16, 17]. *ATCh* izolowana z tkanek roślinnych ma podobne właściwości molekularne i biochemiczne jak enzym oczyszczony z komórek nerwowych [58]. Jednakże u roślin może funkcjonować specyficzny mechanizm kontroli syntezy *ACh*.

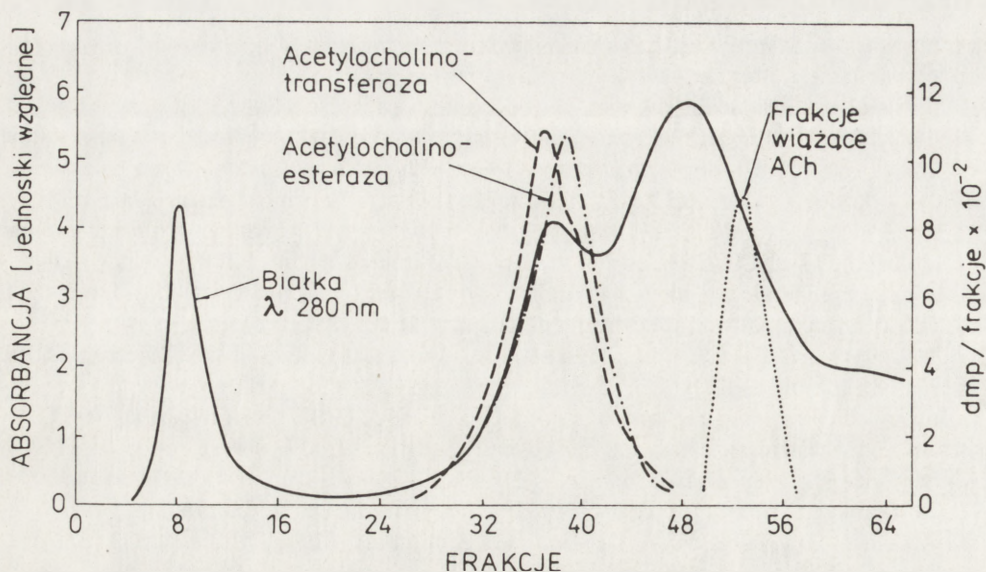
Z danych uzyskanych przez Hartmanna i wsp. [16] oraz Jaffego [30] wynika, że zarówno włączanie radioaktywnych prekursorów do *ACh* [16], jak i tempo syntezy *ACh* w izolowanych cysternach retikulum endoplazmatycznego [30], kontrolowane są przez fitochrom (*P*). Wykazano, że naświetlanie roślin *R* podwyższa, a *FR* obniża zawartość *ACh* w wierzchołkach korzeni *Phaseolus aureus* [29], w kallusie dwugatunkowego mieszańca mchu [18], w tkankach *Phaseolus vulgaris*, *Pisum sativum*, *Sinapis alba*, *Cucurbita pepo*, *Helianthus annuus*, *Spinacia oleracea*, *Amaranthus canolathus* [19], *Pinus silvestris* [33] oraz *Avena sativa* [60]. Również światło białe podwyższa tempo syntezy *ACh* w siewkach *Avena* [59] oraz zawartość tej substancji w liściach *Phaseolus aureus* [37]. U *Lemna gibba* G3 wyższy poziom *ACh* wykryto w roślinach rosnących przy tzw. długim fotoperiodzie w porównaniu do roślin hodowanych przy krótkim fotoperiodzie [26]. Jak dotąd jedynie Satter i wsp. [47] nie potwierdzili udziału *P* w regulacji syntezy *ACh* w liściach *Albizia julibrissin*.

### DEGRADACJA *ACh*

W komórkach nerwowych *ACh* rozkładana jest przez *AChE* (EC 3.1.1.7). Ponadto w komórkach nienerwowych związek ten może być hydrolizowany przez pseudocholinoesterazę lub tzw. butyrylocholinoesterazę (EC 3.1.1.18) [40]. Również w roślinach wykryto enzym rozkładający *ACh*. Aktywność cholinoesterazową stwierdzono w tkankach ponad 100 [9, 17, 38], a jej brak w tkankach 60 gatunków roślin [17]. Obecność *AChE* wykryto we wszystkich organach siewek fasoli [10]. W komórkach korzeni fasoli aktywność *AChE* stwierdzono w ścianach komórkowych [10]. W komórkach warstwy aleuronowej ziarniaków pszenicy [66] oraz w komórkach koleoptyli owsa [60] obecność enzymu zlokalizowano po zewnętrznej stronie błony komórkowej. Aktywność *AChE* została również stwierdzona na powierzchni pelliculi powlekającej znamiona słupek *Pharbitis nil* [2] oraz w chloroplastach liści grochu [44]. Molekularną i biochemiczną charakterystykę cholinoesteraz roślin przedstawiono w poprzedniej pracy [57].

### RECEPTORY *ACh*

Jak dotąd nie uzyskano bezpośrednich dowodów potwierdzających istnienie *AChR* u roślin. Fluck i Jaffe [8] zakładali, że roślinne *AChR* mogą mieć dwojakiego typu właściwości biochemiczne. Mogą one wykazywać właściwości nienzymatycznego białka regulacyjnego kontrolującego np. przepuszczalność błon. W drugim przypadku roślinne *AChR* mogą być powiązane z enzymami regulującymi przebieg określonych przemian metabolicznych. We wstępnych badaniach prowadzonych na ekstraktach korzeni fasoli Jaffe [cyt.



RYS. 1. Obecność aktywności acetylocholinoesterazy (*AChE*), acetylotransferazy cholinowej (*ATCh*) oraz frakcji wiążących [<sup>14</sup>C]-acetylocholinę (*ACh*) w ekstraktach izolowanych ze ścian komórkowych hypokotyli fasoli (na podstawie [17])

za 8] wykazał obecność miejsc wiążących. Hartmann i wsp. [cyt. za 17] stwierdzili wysokie powinowactwo *ACh* do białek frakcji ścian komórkowych *Phaseolus vulgaris*. W badanym ekstrakcie wykryto również aktywność *AChE* i *ATCh* (rys. 1) [17] oraz obecność *ACh* [19]. Jednakże ani Jaffe, ani Hartmann i wsp. nie przeprowadzili biochemicznej charakterystyki "miejsc wiążących" *ACh*.

Użycie agonistów (muskaryna, nikotyna) i antagonistów (atropina, d-tubokuraryna) *ACh* dostarczyło pośrednich dowodów na istnienie *AChR* u roślin.

Atropina podwyższała poziom ATP w pąkach fasoli [32] i aktywność kinazy cholinowej [20], znosiła stymulacyjny wpływ *R* i *ACh* na zmianę wzorca wzrostu siewek *Vigna* [25], przeciwdziałała stymulowanemu *ACh* kurczeniu się komórek perycyklu korzeni fasoli [51], znosiła stymulowane IAA kwitnienie *Lemna gibba* G3 [24] oraz hamowała włączanie <sup>32</sup>Pi do cząsteczek fosfolipidów hypokotyli fasoli [21]. Z drugiej strony atropina w niewielkim stopniu redukowała stymulowaną gibereliną elongację hypokotyli ogórka [67] oraz nie wywierała wpływu na stymulowane auksyną wydłużanie segmentów koleoptyli owsa [7], na syntezę sanoparyny w tkankach jęczmienia [48] i na kiełkowanie fotoblastycznych nasion *Rumex obtusifolius* i *Cucumis anguria* [36]. Ponadto stwierdzono, że d-tubokuraryna hamuje stymulowane *R* pobieranie [<sup>14</sup>C]-octanu sodowego przez izolowane wierzchołki korzeni fasoli [31], natomiast nikotyna indukuje morfogenezę korzeni w kallusie tytoniu [41]. Muskaryna i atropina w stężeniu równym lub wyższym od 1 nM hamowała do 50% tempo fotoredukcji NADP<sup>+</sup> i niecyklicznej fosforylacji w chloroplastach grochu [43]. D-tubokuraryna znacznie słabiej hamowała obydwa wymienione procesy. Muskaryna, podobnie jak *ACh*, stymulowała odpowiednio 15- i 2-krotnie wpływ Na<sup>+</sup> i K<sup>+</sup> z chloroplastów, natomiast atropina i d-tubokuraryna w niewielkim stopniu wpływały na transport obu kationów przez błony wspomnianych organelli komórkowych [43]. Z drugiej strony

d-tubokuraryna bardzo silnie hamowała stymulowany *ACh* wypływ  $\text{Na}^+$  z chloroplastów. Roshchina [43] przypuszcza, że w błonach chloroplastów grochu występują *AChR* regulujące przepuszczalność ich błon dla jonów. Istnienie *AChR* w roślinach postulowali również Raineri i Modenesi [42]. Autorzy ci sugerowali, że *ACh* mogła regulować przepuszczalność błon u praorganizmów, z których następnie powstały najprymitywniejsze rośliny i zwierzęta.

## WPLYW *ACh* NA PROCESY ZWIĄZANE Z PRZEPUSZCZALNOŚCIĄ BŁON

Egzogenna *ACh* wpływa u roślin na wiele procesów indukowanych zmianami przepuszczalności błon dla jonów [17, 54, 56]. Pierwszym zjawiskiem, którego przebieg modyfikowała *ACh*, był tzw. efekt Tanady [28].

### EFEKT TANADY

*R* stymuluje przyleganie wierzchołków korzeni do ujemnie naładowanych powierzchni szklanych, natomiast *FR* odwraca efekt *R* powodując ich uwalnianie do środowiska [65]. *ACh* w stężeniu 0,1 mM, naśladując działanie *R*, powodowała wiązanie się izolowanych wierzchołków korzeni fasoli ze szkłem [28]. Atropina i AMO-1618 (retardant wzrostu) podawane w ciemności działały podobnie do *R* i *ACh*. Z drugiej strony obie te substancje, a także paraoksan (insektycyd) i CCC (retardant wzrostu) zastosowane równoległe z *R* częściowo znosiły efekt tej długości światła [28, 29]. Eseryna podwyższała wrażliwość tkanek na działanie *R* i *ACh* oraz podobnie jak *ACh* hamowała stymulowane *FR* uwalnianie korzeni do środowiska inkubacyjnego [29].

Przy użyciu chromatografii bibułowej oraz różnych biotestów Jaffe [28, 29] wykazał, że w badanych wierzchołkach korzeni fasoli obecna jest endogenna *ACh*. Ponadto stwierdził, że *R* stymuluje, a *FR* hamuje syntezę *ACh* w tkankach korzeni i jej uwalnianie do środowiska. W siewkach fasoli, poza wpływem na efekt Tanady, *ACh* oddziaływała na trzy inne regulowane przez *P* procesy. Podobnie jak *R* substancja ta hamowała powstawanie korzeni wtórnych oraz stymulowała wypływ  $\text{H}^+$  do środowiska i indukowała powstawanie dodatnich potencjałów powierzchniowych w tkankach tychże korzeni [28, 29]. W 1970 roku Jaffe [28] opublikował następujący model działania *ACh* na procesy zachodzące w wierzchołkach korzeni fasoli (rys. 2).

W modelu tym Jaffe proponował, że powstawaniu pod wpływem *R* aktywnej formy *P*, zwanej *P<sub>f</sub>* [64, 65] towarzyszy wzrost tempa syntezy *ACh*. Podwyższenie poziomu *ACh* w tkankach stymuluje wypływ  $\text{H}^+$  z komórek korzeni, co powoduje powstawanie na ich powierzchni dodatnich potencjałów, które są przyczyną przylegania badanych organów do szkła. Wzrost zawartości endogennej *ACh* prowadzi również, według Jaffego, do zahamowania powstawania korzeni wtórnych. Odwrotnie, naświetlanie korzeni *FR* stymuluje powstawanie formy fitochromu, zwanej *P<sub>r</sub>* [64, 65], która podwyższając tempo rozkładu *ACh* wpływa na uwalnianie omawianych organów ze szkła oraz na ich normalną organogenezę [28].

Poza Jaffem również inni autorzy potwierdzili udział *P* w kontroli przebiegu efektu Tanady [65]. Jednakże nie udało się potwierdzić roli *ACh* jako regulatora w kontroli tego procesu. Wykazano, że jony sodowe, w stężeniu niższym od *ACh*, naśladują działanie *R*. Z drugiej strony jony potasowe, podobnie jak *FR* stymulują uwalnianie wierzchołków korzeni ze szkła [30].

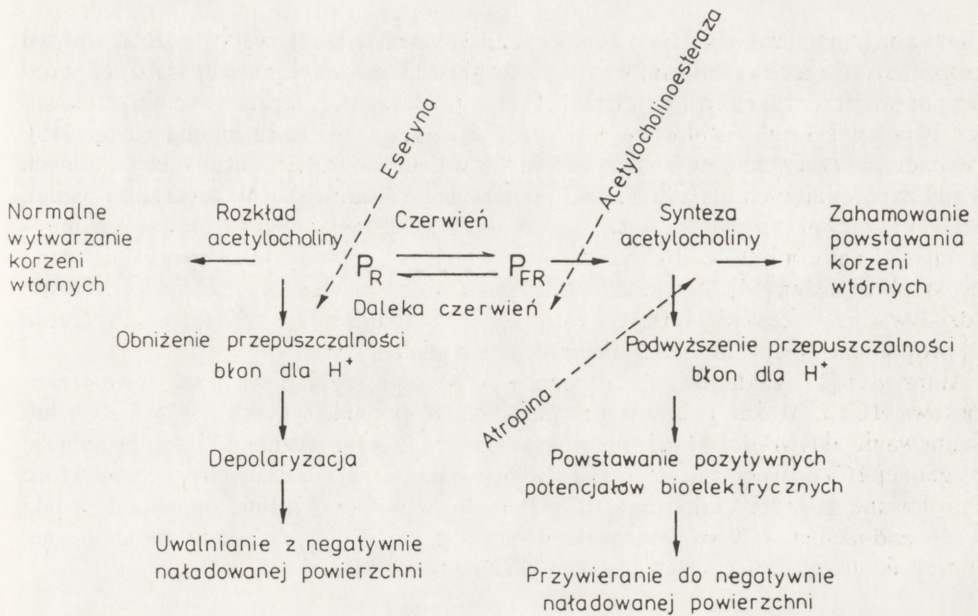
### WPLYW *ACh* NA RUCHY LIŚCI

Nyktynastyczne ruchy liści *Mimosa pudica*, *Albizia julibrissin* i *Samanea saman* kontrolowane są przez *P* [65]. Światło wpływając na szybkie zmiany przepuszczalności błon dla jonów w tkankach poduszeczki podliściowej stymuluje wzrost turgoru w komórkach motorycznych poduszeczki. Jest to przyczyną ruchu liści [65]. Opierając się na podobieństwie wspomnianych procesów do szybkich zmian transportu jonów, które zachodzą w komórkach nerwowych, Toriyama i Jaffe [52] zasugerowali możliwość udziału *ACh* w regulacji ruchów liści mimozy. Badania przeprowadzone przez Satter i wsp. [47] zaprzeczyły możliwości uczestnictwa *ACh* w regulacji ruchów liści u *Mimosa pudica*, *Albizia julibrissin*, *Samanea saman* i *Phaseolus multiflorus*. Przy użyciu biotestu autorzy ci wykazali brak różnic w zawartości *ACh* w tkankach blaszek liściowych i poduszek podliściowych wymienionych roślin. Ponadto wykryli brak zmian poziomu *ACh* w tkankach poduszek podczas regulowanych przez *P* ruchach liści. Również podawanie egzogennej *ACh* (od 10  $\mu\text{M}$  do 1 mM) nie wywierało żadnego wpływu na ruchy liści *Samanea* tak w ciemności, jak i podczas ich naświetlania *R* lub *FR* [47]. Wyniki przeciwstawne do opisanych uzyskali Kumaraval i wsp. [34]. Wykazali oni, że zawartość *ACh* w złożonych (w ciemności) listkach *Samanea saman* jest wyższa niż w otwartych (na świetle).

### WPLYW *ACh* NA PRZEPUSZCZALNOŚĆ BŁON DLA JONÓW

Jaffe [28] jako pierwszy zaproponował, że pierwotny mechanizm działania *ACh* w roślinach polega na regulacji przepuszczalności błon dla jonów. Autor ten wykazał, że *ACh* stymuluje wpływ  $\text{H}^+$  z komórek izolowanych wierzchołków korzeni [28]. Greppin i wsp. [11] opisali indukcyjny wpływ omawianej substancji na powstawanie potencjałów bioelektrycznych w komórkach liści szpinaku. Natomiast Hartmann [13, 14] stwierdził, że *ACh* nie wpływa na zmiany potencjałów powierzchniowych, izolowanych hypokotyli fasoli. Jednakże, wraz ze wzrostem jej stężenia w środowisku *ACh* hamowała stymulowaną światłem niebieskim hyperpolaryzację wspomnianych potencjałów, jak również obniżała tempo pobierania  $\text{K}^+$  przez badane tkanki [14]. Wcześniej Jaffe [29] oraz Evans [7] postulowali wpływ *ACh* na błonowy transport  $\text{Ca}^{2+}$ . Tretyn [53] wykrył, że *ACh* podobnie jak *R* podwyższa tempo pobierania  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  przez wycinki etiolowanych kolecyptyli owsa. Roshchina [43] przeprowadziła badania nad wpływem *ACh*, jej agonistów i antagonistów na transport  $\text{Na}^+$  i  $\text{K}^+$  w izolowanych chloroplastach liści grochu. Autorka przypuszcza, że stymulowany przez *ACh* wpływ jonów sodowych i potasowych do środowiska kontrolowany jest przez obecne w błonach chloroplastów *AChR*. Na możliwość udziału *AChR* w regulacji przepuszczalności błon dla jonów wskazywało wcześniej kilku autorów [24, 26, 42].





RYS. 2. Wpływ acetylcholinyl na procesy zachodzące w wierzchołkach korzeni fasoli (opis w tekście); przerywaną linią zaznaczone zostały przypuszczalne miejsca hamującego działania eseryny, atropiny i *AChE* na różne etapy proponowanego łańcucha zdarzeń (na podstawie [28])

## WPLYW *ACh* NA METABOLIZM FOSFOLIPIDÓW

U zwierząt *ACh* reguluje przepuszczalność błon dla jonów w postaci dwu odmiennych procesów. W komórkach nerwowych *ACh* łącząc się z receptorami stymuluje aktywność kanałów jonowych [5]. W komórkach nienerwowych *ACh* podwyższa przepuszczalność błon dla jonów aktywując enzymy związane z rozpadem fosfolipidów błonowych [23]. Enzymy te stymulują powstawanie diacyloglicerolu (*DAG*) i 1,4,5-trifosforanu inozytolu (*IP*<sub>3</sub>), które pełnią funkcję drugich przekaźników [35, 39]. Fluck i Jaffe [8] jako pierwsi zasugerowali wpływ *ACh* na metabolizm fosfolipidów u roślin. Hartmann i wsp. [21] wykazali, że w warunkach tlenowych 10- $\mu$ M roztwór *ACh* hamuje włączanie <sup>32</sup>Pi do cząsteczek fosfolipidów izolowanych z wycinków etiolowanych hypokotyli fasoli. W warunkach beztlenowych *ACh* i atropina działały stymulująco na badany proces [21]. Szczegółowe badania wykazały, że w warunkach tlenowych *ACh* hamuje włączanie <sup>32</sup>Pi do frakcji fosfolipidów zawierających fosfatydyloetanolaminę (*PE*) i fosfatydylocholinę (*PC*), a stymuluje jego włączanie do frakcji wzbogaconej w fosfatydyloinozytol (*PI*) [17]. Badania przeprowadzone przez Hartmanna i wsp. [20–22] potwierdziły podobieństwo metabolizmu fosfolipidów u roślin i zwierząt.

## PODSUMOWANIE DOTYCHCZASOWYCH BADAŃ

Dane na temat działania *ACh* w komórkach roślinnych są kontrowersyjne. Brak wpływu egzogennej *ACh* na metabolizm, wzrost i rozwój roślin można tłumaczyć słabą jej penetracją do wnętrza tkanek roślinnych [54]. Tempo pobierania *ACh* przez wycinki etiolowanych hypokotyli fasoli regulowane jest przez *R* i odczyn roztworu inkubacyjnego [15]. Doświadczenia z użyciem *ACh* należy prowadzić w kontrolowanych warunkach świetlnych i w pH zapewniających maksymalne jej pobieranie ze środowiska. W większości badań, poza dotyczącymi wpływu *ACh* na syntezę ATP oraz metabolizm izolowanych mitochondriów i chloroplastów, aby wykazać wpływ tego związku na badany proces, używano jego wysokich stężeń [54]. Stosowana w tak wysokich stężeniach *ACh* może niespecyficznie oddziaływać na procesy zachodzące w roślinach. Z tego założenia wyszli Hartmann i Gupta [17] proponując kolejny model działania *ACh* w roślinach (rys. 3).

Autorzy ci [17] zakładają, że egzogenna *ACh* ulega rozkładowi przez zewnątrzkomórkową *AChE*. Można jednakże przypuszczać, że podanie wysokich stężeń *ACh* lub zahamowanie aktywności *AChE* (np. przez eserynę lub *R*) prowadzi do przedostania się egzogennej *ACh* do wnętrza komórki i do zainicjowania w niej tych samych procesów, które kontrolowane są przez endogenną *ACh*. Ponadto w modelu tym nie określono, w jaki sposób endogenna *ACh* wpływa na kontrolowane przez nią przemiany metaboliczne. Autorzy nie uwzględnili również możliwości istnienia *AChR* u roślin.

## PROTOPLASTY JAKO MODEL DO BADANIA MECHANIZMU DZIAŁANIA *ACh* W ROŚLINACH

Z dokonanego przeglądu literatury wynika, że *ACh* może naśladować działanie *R* w regulacji fotomorfogenezy roślin [17]. Wpływ tej substancji na procesy zachodzące w roślinach może dotyczyć kontroli przepuszczalności błon dla  $K^+$ ,  $Na^+$  i  $Ca^{2+}$ .

Uwzględniając te spostrzeżenia postanowiono zbadać oddziaływanie *ACh* na pęcznienie protoplastów izolowanych z etiolowanych liści pszenicy. Pęcznienie wspomnianych protoplastów kontrolowane jest przez *P* [3]. W izotonicznym roztworze sorbitolu 1-minutowy impuls *R* powoduje wzrost objętości protoplastów. Stymulacyjne działanie *R* na ten proces ujawnia się jedynie w środowisku zawierającym  $Ca^{2+}$  i jest znoszone 3-minutowym impulsem *FR*. Protoplasty zaczynają pęcznieć natychmiast po ich naświetleniu *R* i osiągają swoją maksymalną objętość kilkanaście minut po przeniesieniu do ciemności [3].

Podobnie jak *R*, również jonofor  $Ca^{2+}$  (A 23187) oraz agonista zwierzęcych kanałów wapniowych – Bay K 8644 stymulują pęcznienie protoplastów inkubowanych w ciemności w roztworze sorbitolu zawierającym  $Ca^{2+}$  [3, 61]. Z drugiej strony, blokery kanałów wapniowych:  $La^{3+}$ , werapamil [5] oraz nifedypina [61], jak również  $Li^+$  [4] (inhibitor rozkładu fosfolipidów błonowych [39]) i inhibitory kalmoduliny (Tretyn i Kendrick, dane niepubl.) znoszą stymulacyjny wpływ *R* na omawiany proces. Ponadto ustalono, że w kontrolowanym przez *P* pęcznieniu protoplastów pszenicy może również uczestniczyć białko *G* [4] ( $G_p$ , białko wiążące *GTP* [23, 39]) oraz kinaza białkowa *C* [4].

### WPLYW *ACh* NA PĘCZNIENIE PROTOPLASTÓW PSZENICY

Protoplasty umieszczone w roztworze sorbitolu zawierającym 0,5 mM  $\text{Ca}^{2+}$  lub 0, 1 mM  $\text{K}^+$  lub 0,1 mM  $\text{Na}^+$  nie zmieniały objętości w wyniku ich naświetlenia 3-minutowym impulsem *FR* [62, 63]. Uprzednio naświetlone *FR* protoplasty poddane działaniu *ACh* pęczniały w ciemności do podobnej objętości jak po naświetleniu *R* [62]. W przeciwieństwie do pęcznienia kontrolowanego przez *P* [3, 61] *ACh* wykazywała swoją aktywność w obecności nie tylko  $\text{Ca}^{2+}$ , lecz również  $\text{K}^+$  i  $\text{Na}^+$  [62, 63]. Maksymalne pęcznienie protoplastów odnotowano w 1  $\mu\text{M}$  roztworze *ACh* [62]. Dodanie do środowiska zawierającego *ACh* eseryny (inhibitora *AChE* [57]) podwyższało efektywność działania *ACh* na badany proces. W środowisku zawierającym eserynę, w obecności  $\text{Ca}^{2+}$  protoplasty osiągały maksymalną objętość w 0,1  $\mu\text{M}$  roztworze *ACh* [62].

Specyficzność wpływu *ACh* na pęcznienie etiolowanych protoplastów liści pszenicy badano stosując kilka pochodnych choliny. Protoplasty inkubowane w środowisku, zawierającym jeden z trzech stosowanych jonów oraz 1  $\mu\text{M}$  choliny lub propionylcholiny, lub butyrylocholiny, nie zmieniały swych objętości. Poza *ACh* jedynie karbamylcholina (karbachol) stymulowała pęcznienie protoplastów [62, 63].

W przeprowadzonych doświadczeniach stwierdzono, że *ACh* wykazuje aktywność w stężeniach niższych od 1  $\mu\text{M}$ . Efekt jej działania obserwowano kilkanaście minut po dodaniu *ACh* do kąpeli zawierającej protoplasty, których pęcznienie poza tą substancją stymulowane było jedynie przez karbamylcholinę. Na tej podstawie uważa się, że *ACh* specyficznie indukuje pęcznienie protoplastów pszenicy [62].

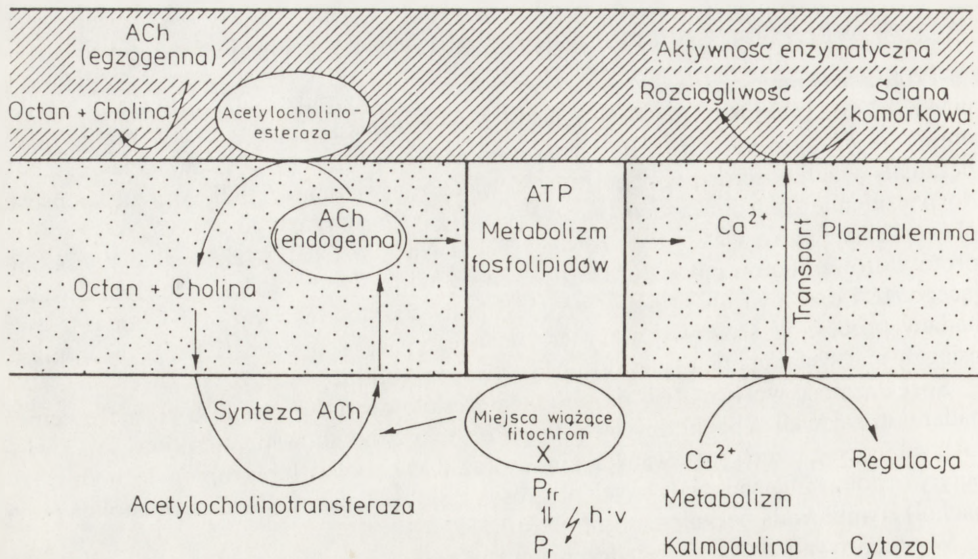
### MECHANIZM DZIAŁANIA *ACh* NA PROTOPLASTY

Stosując substancje blokujące działanie *ACh* u zwierząt [5, 6, 23] badano mechanizm wpływu *ACh* na pęcznienie etiolowanych protoplastów pszenicy. Nifedypina i  $\text{La}^{3+}$  przeciwdziałały zależnemu od  $\text{Ca}^{2+}$  i stymulowanemu przez *ACh* pęcznieniu protoplastów [62]. Podobnie działały:  $\text{Li}^+$  [63], inhibitory kalmoduliny [62, 63] oraz GDP-B-S (inhibitor *G<sub>p</sub>*) [Bossen, dane niepubl.]. Wszystkie wymienione substancje, z wyjątkiem inhibitorów kalmoduliny, nie wywierały żadnego wpływu na zależne od  $\text{K}^+/\text{Na}^+$  i indukowane przez *ACh* pęcznienie protoplastów [62, 63].

### WPLYW AGONISTÓW I ANTAGONISTÓW *AChR* NA PROTOPLASTY

W celu sprawdzenia możliwości udziału *AChR* w kontroli pęcznienia protoplastów zbadano wpływ agonistów oraz antagonistów *AChR* na ten proces. Doświadczenia prowadzono w środowisku zawierającym  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$  lub  $\text{Na}^+$  oraz jeden z badanych związków.

Nikotyna (agonista *nAChR*) we wszystkich badanych stężeniach stymulowała pęcznienie protoplastów w kąpeli zawierającej  $\text{K}^+$  lub  $\text{Na}^+$ . Optymalne stężenie nikotyny wynosiło 0,1  $\mu\text{M}$ . Protoplasty inkubowane w środowisku zawierającym  $\text{Ca}^{2+}$  i traktowane nikotyną nie zmieniały swojej objętości [63]. Wyniki przeciwstawne do opisanych uzyskano w doświadczeniach, w których zastosowano muskarynę (agonista *mAChR*). Substancja ta stymulowała pęcznienie protoplastów w obecności  $\text{Ca}^{2+}$ , nie wywierając żadnego wpływu na objętość protoplastów inkubowanych w roztworze  $\text{K}^+$  lub  $\text{Na}^+$  [63].



RYS. 3. Model Hartmanna i Gupty ilustrujący mechanizm działania acetylocholino- w komórkach roślinnych: fotokonwersji fitochromu (z  $P_{fr}$  do  $P_r$ ) towarzyszy wiązanie się powstającej aktywnej formy  $P_r$  z jej podobnymi receptorami; powstały kompleks  $P_r$ -receptor stymuluje wzrost aktywności  $ATCh$ , co prowadzi do podwyższenia poziomu  $ACh$  w komórce; po osiągnięciu określonego, wewnątrzkomórkowego stężenia  $ACh$  stymuluje procesy oddechowe i rozkład fosfolipidów błonowych, które regulując aktywność kanałów wapniowych wpływają na wzrost komórki i na szereg procesów fizjologicznych (na podstawie [17])

Wpływ antagonistów  $AChR$  na protoplasty również zależał od składu jonowego kąpeli. Atropina (antagonista  $mAChR$ ) w stężeniu od 1 do 10  $\mu M$ , w środowisku zawierającym  $K^+$  lub  $Na^+$ , nie wpływała na stymulowane  $ACh$  pęcznienie protoplastów. Z drugiej strony, związek ten w obecności  $Ca^{2+}$  znosił stymulacyjny wpływ  $ACh$  [63]. D-tubokuraryna (antagonista  $nAChR$ ) w kąpeli zawierającej  $Ca^{2+}$  tylko nieznacznie hamowała pęcznienie protoplastów, natomiast całkowicie blokowała wpływ  $ACh$  na badany proces w środowisku zawierającym  $K^+$  lub  $Na^+$  [63].

### LOKALIZACJA $AChR$ W PROTOPLASTACH PSZENICY

Wyniki doświadczeń przeprowadzonych z użyciem agonistów i antagonistów  $AChR$  na proces pęcznienia sugerowały możliwość istnienia receptorów  $ACh$  w protoplastach etiolowanych liści pszenicy. Ich wstępną lokalizację przeprowadzono stosując wyznakowaną fluoresceiną  $\alpha$ -bungarotoksynę ( $FITC-BTx$ ). Bungarotoksyna to białkowa toksyna izolowana z jadu kobry (*Bungarus multicinctus*) specyficznie łącząca się z  $nAChR$  (tworzących kanał jonowy dla  $K^+$  i  $Na^+$ ) powodując utratę ich fizjologicznych właściwości [5].

$BTx$  całkowicie blokowała zależną od  $K^+/Na^+$  i stymulowaną  $ACh$  zmianę objętości protoplastów. Badana toksyna nie wywierała żadnego wpływu na indukowane  $ACh$  pęcznienie protoplastów inkubowanych w kąpeli zawierającej  $Ca^{2+}$  (Tretyn i Kendrick, w przygotowaniu do druku).

Stosując procedurę wykrywania *nAChR*, opisaną wcześniej dla komórek zwierzęcych [45], badano ich występowanie w protoplastach pszenicy. Inkubacja etiolowanych protoplastów w roztworze *FITC-BTx* ( $1 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ ) spowodowała wyznakowanie się badanych komórek użytą toksyną. Wyznakowaniu uległy wszystkie protoplasty, a fluorescencję kompleksu *FITC-BTx* obserwowano głównie na ich powierzchni. Preinkubacja protoplastów z niewyznakowaną *BTx* blokowała wiązanie się *FITC-BTx* z badanymi komórkami (Tretyn i Kendrick, w przygotowaniu do druku). Przedstawione dane są pierwszymi bezpośrednimi dowodami potwierdzającymi możliwość występowania *AChR* w komórkach roślinnych.

### PORÓWNANIE DZIAŁANIA *P* I *ACh* NA PĘCZNIENIE PROTOPLASTÓW

*ACh* wpływa na wzrost i rozwój roślin podobnie jak *R* [8, 17]. Wyniki badań prowadzonych na protoplastach izolowanych z etiolowanych liści pszenicy częściowo potwierdziły tę możliwość. Jednakże uzyskano szereg danych zaprzeczających możliwości podobnego oddziaływania *ACh* i *P* na pęcznienie wymienionych protoplastów.

Podsumowując wyniki wspomnianych badań można stwierdzić, że:

1) *FR* odwraca indukcyjny wpływ *R*, lecz traci swoją aktywność po uprzednim potraktowaniu protoplastów *ACh* [62].

2) Podczas gdy *R* wykazuje aktywność w środowisku zawierającym  $\text{Ca}^{2+}$ , *ACh* indukuje pęcznienie w środowisku zawierającym  $\text{Ca}^{2+}$  lub  $\text{Na}^+$ , lub  $\text{K}^+$  [61–63].

3) Zarówno atropina, jak i d-tubokuraryna, hamujące odpowiednio  $\text{Ca}^{2+}$ - i  $\text{K}^+/\text{Na}^+$ -zależne i indukowane przez *ACh* pęcznienie protoplastów nie znosiły stymulacyjnego wpływu *R* na badany proces [63].

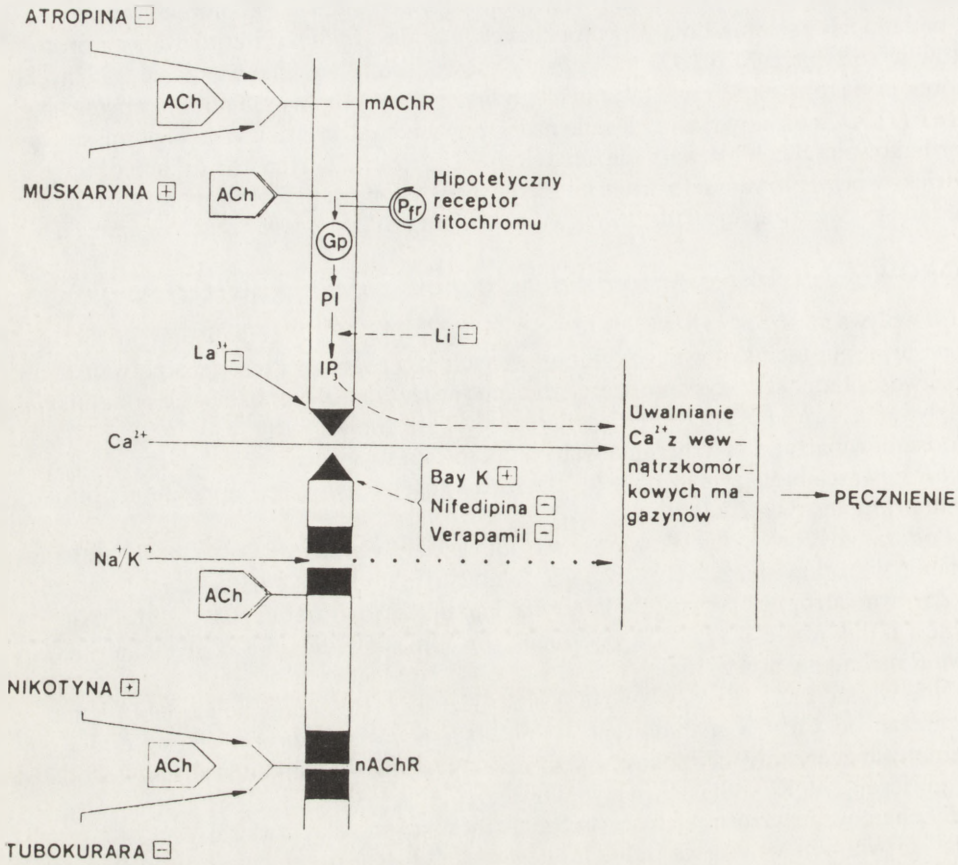
4) Nifedypina,  $\text{La}^{3+}$ ,  $\text{Li}^+$  [3–4, 62–63] oraz  $\text{GDP-}\beta\text{-S}$  (Bossen, dane niepubl.) hamowały zależne od  $\text{Ca}^{2+}$  i stymulowane *R* lub *ACh* pęcznienie protoplastów. Zaden z wymienionych związków nie blokował pęcznienia protoplastów inkubowanych w środowisku zawierającym  $\text{K}^+$  lub  $\text{Na}^+$ , a stymulowanego *ACh* [63].

5) *BTx* hamowała wzrost objętości protoplastów w środowisku zawierającym *ACh* oraz  $\text{K}^+/\text{Na}^+$  i była bez wpływu na indukowane przez *R* i *ACh* pęcznienie protoplastów w środowisku z  $\text{Ca}^{2+}$  (Tretyn i Kendrick, w przygotowaniu do druku).

### ZAKOŃCZENIE

Wyniki badań prowadzonych na protoplastach liści pszenicy zostały podsumowane na załączonym rysunku (rys. 4) [56].

Przedstawiony model działania *ACh* na pęcznienie protoplastów sprawdzono na innym, regulowanym przez *P* i zależnym od  $\text{Ca}^{2+}$  systemie roślinnym: rozwijaniu się liści etiolowanych siewek traw [68]. Wykazano, że *R* indukuje rozwijanie się wycinków etiolowanych liści pszenicy (z których izolowano również protoplasty) jedynie w obecności  $\text{Ca}^{2+}$ . *ACh* stymulowała ten proces w kąpieli zawierającej  $\text{Ca}^{2+}$ , jak i  $\text{K}^+$  lub  $\text{Na}^+$  [55]. Po przebadaniu wpływu agonistów i antagonistów *AChR*, nifedypiny,  $\text{La}^{3+}$ ,  $\text{Li}^+$  i chlorpromazyny (inhibitora kalmoduliny) okazało się, że podobnie jak w przypadku protoplastów *ACh* może regulować rozwijanie się wycinków liści pszenicy poprzez wpływ na dwa odmienne typy receptorów: *nAChR* i *mAChR* [55].



RYS. 4. Hipotetyczny schemat działania acetylocholino na proces pęcznienia protoplastów pszenicy: ACh stymuluje pęcznienie przez AChR; zakłada się, że w błonach protoplastów funkcjonują dwa typy receptorów: nAChR i mAChR kontrolujących odpowiednio (przez aktywację kanałów jonowych) ich przepuszczalność dla K<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup> i Ca<sup>2+</sup>; działanie mAChR jest zależne, a nAChR niezależne od metabolizmu fosfolipidów błonowych (PI, fosfatydyloinozytol; IP<sub>3</sub> trifosforan inozytolu) oraz białka wiążącego GTP (Gp). Podobieństwo pomiędzy działaniem AChR poprzez mAChR oraz R poprzez P na pęcznienie protoplastów polega na tym, że w obu przypadkach istnieje wspólny łańcuch transdukcji sygnału prowadzący do podobnej odpowiedzi fizjologicznej; [+] – oznacza stymulujący, natomiast [-] – hamujący wpływ zaznaczonych substancji na proponowany łańcuch zdarzeń (tubokurara = d-tubokuraryna; wewnętrzne magazyny = struktury gromadzące Ca<sup>2+</sup>; ER, wakuole, mitochondria) (na podstawie [56])

## LITERATURA

- [1] BARLOW RB, DIXON ROD. Choline acetyltransferase in the nettle *Urtica dioica* L. *Biochem J* 1973; 132: 15–18.
- [2] BEDNARSKA E, TRETYN A. Ultrastructural localization of acetylcholinesterase in the stigma of *Pharbitis nil*. *Cell Biol Int Rep* 1989;13: 275–282.
- [3] BOSSEN ME, DASSEN HHD, KENDRICK RE, VREDENBERG WJ. The role of calcium ions in phytochrome-controlled swelling of etiolated wheat (*Triticum aestivum* L.) protoplasts. *Planta* 1988; 174: 94–100.

- [4] BOSSEN ME, KENDRICK RE, VREDENBERG WJ. The involvement of a G-protein in phytochrome-regulated swelling of wheat protoplasts. *Physiol Plant.*, w druku.
- [5] CHANGÉAUX JP, DEVILLERS-TLHIERY A, CHEMOUILLI P. Acetylcholine receptors: An allosteric protein. *Science* 1984; **225**: 1335-1345.
- [6] DUNAT Y, ISRAËL M. The release of acetylcholine. *Sci Amer* 1985; **252**: 40-48.
- [7] EVANS ML. Promotion of cell elongation in *Avena* coleoptiles by acetylcholine. *Plant Physiol* 1972; **50**: 414-416.
- [8] FLUCK RA, JAFFE MJ. The acetylcholine system in plants. [w] Smith H red. *Current Advance in Plant Science*. Vol. 5, Oxford: Science, Engineering, Medical and Data Ltd. 1974: 1-22.
- [9] FLUCK RA, JAFFE MJ. The distribution of cholinesterases in plant species. *Phytochemistry* 1974; **13**: 2475-2480.
- [10] FLUCK RA, JAFFE MJ. Cholinesterases from plant tissues. III. Distribution and subcellular localization in *Phaseolus aureus* Roxb. *Plant Physiol* 1974; **53**: 752-758.
- [11] GREPPINH, HOROWITZ BA, HOROWITZ LP. Light-stimulated bioelectric responses of spinach leaves and photoperiodic induction. *Z Pflanzenphysiol* 1973; **68**: 336-345.
- [12] HADACOVA V, HOFMAN J, MALINI deALMAIDA R, VACKOVA K, KUTACEK M, KLOZOVA E. Choline esterases and choline acetyl transferase in seed of *Allium altaicum* (Pall.) Reysa. *Biol Plant* 1981; **23**: 220-227.
- [13] HARTMANN E. Influence of light on the bioelectric potential of the bean (*Phaseolus vulgaris* L.) hypocotyl hook. *Physiol Plant* 1975; **33**: 266-275.
- [14] HARTMANN E. Influence of acetylcholine and light on the bioelectric potential of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) hypocotyl hook. *Plant Cell Physiol* 1977; **18**: 1203-1207.
- [15] HARTMANN E. Uptake of acetylcholine by bean hypocotyl hooks. *Z Pflanzenphysiol* 1978; **86**: 303-311.
- [16] HARTMANN E. Attempts to demonstrate incorporation of labeled precursors into acetylcholine by *Phaseolus vulgaris* seedlings. *Phytochemistry* 1979; **18**: 1643-1646.
- [17] HARTMANN E, GUPTA R. Acetylcholine as a signaling system in plants. [w] Boss WE, Marre DJ, Liss AR red., *Second Messengers in Plant Growth and Development*. Oxford 1989: 257-287.
- [18] HARTMANN E, KILBINGER K. Gas-liquid-chromatographic determination of light-dependent acetylcholine concentration in moss callus. *Biochem J* 1974; **137**: 249-252.
- [19] HARTMANN E, KILBINGER K. Occurrence of light-dependent acetylcholine concentration in higher plants. *Experientia* 1974; **30**: 1387-1388.
- [20] HARTMANN E, SCHLEICHER W. Isolierung und Charakterisierung einer Cholin kinase aus *Phaseolus vulgaris* L. - Keimlingen. *Z Pflanzenphysiol* 1977; **83**: 69-80.
- [21] HARTMANN E, GRASMUCK I, LEHRBACH N, MULLER R. The influence of acetylcholine and choline on the incorporation of phosphate into phospholipids of etiolated bean hypocotyl hooks. *Z Pflanzenphysiol* 1980; **97**: 377-389.
- [22] HOCK K, HARTMANN E. Localization of phosphatidylcholine synthesizing enzymes in etiolated bean seedlings (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Sci Lett* 1981; **21**: 389-396.
- [23] HOKIN LE. Receptors and phosphoinositol-generated second messengers. *Ann Rev Biochem* 1985; **54**: 205-235.
- [24] HOSHINO T. Stimulation of acetylcholine action by  $\beta$ -indolacetic acid in inducing diurnal change of floral response to chilling under continuous light in *Lemna gibba* G3. *Plant Cell Physiol* 1979; **20**: 43-50.
- [25] HOSHINO T. Effects of acetylcholine on the growth of the *Vigna* seedlings. *Plant Cell Physiol* 1983; **24**: 551-556.
- [26] HOSHINO T, OOTA T. The occurrence of acetylcholine in *Lemna gibba* G3. *Plant Cell Physiol* 1978; **19**: 769-776.
- [27] ISRAËL M, MANARANCHE R. The release of acetylcholine: From the cellular towards a molecular mechanism. *Biol Cell* 1985; **55**: 1-14.
- [28] JAFFE MJ. Evidence for the regulation of phytochrome-mediated process in bean roots by the neurohumor, acetyl choline. *Plant Physiol* 1970; **46**: 768-777.
- [29] JAFFE MJ. Acetylcholine as a native metabolic regulator of phytochrome-mediated process in bean roots. [w] Runeckles VC, Tso TC. red. *Structural and Functional Aspects of Phytochemistry*, Vol. 5. New York-London: Academic Press 1972: 80-104.
- [30] JAFFE MJ. Phytochrome-controlled acetylcholine synthesis at the endoplasmic reticulum. [w] Smith H. red. *Light and Plant Development*. London: Butterworths 1976: 333-344.
- [31] JAFFE MJ, THOMA L. Rapid phytochrome-mediated changes in uptake by bean roots of sodium acetate [ $^{14}$ C] and their modification by cholinergic drugs. *Planta* 1973; **113**: 283-291.

- [32] KIRSHNER RL, WHITE JM, PIKE CS. Control of bean bud ATP level by regulatory molecules and phytochrome. *Physiol Plant* 1975; **34**: 375–377.
- [33] KOPCEWICZ J, CYMERSKI M, PORAZIŃSKI Z. Influence of red and far-red irradiation on the acetylcholine and gibberellin content in Scots pine seedlings. *Bull Acad Polon Sci* 1977; **25**: 114–117.
- [34] KUMARAVALLI M, SUNDERAN R, RAO DS. Studies on active chemical principles responsible for nyctinastic behavior of *Samanea saman*. *Ind J Biochem Biophys* 1979; **16**: 89–90.
- [35] KUZNICKI J. Transport i funkcje wapnia u *Eucariota*. *Kosmos* 1988; **37**: 197–217.
- [36] LEDEIRA A, FELIPPE GM, DIETRICH SM. Detection of acetylcholine and effects of exogenous ACh on *Rumex* and *Cucumis* photoblasticity. *Rev Brasil Bot* 1982; **5**: 17–19.
- [37] MIURA GH, SHIH T-M. Cholinergic constituents in plants: Characterization and distribution of acetylcholine and choline. *Physiol Plant* 1984; **56**: 28–32.
- [38] MIURA GA, BROOMFIELD CA, LAWSON MA, WORTHEY EG. Widespread occurrence of cholinesterase activity in plant leaves. *Physiol Plant* 1982; **56**: 28–32.
- [39] NOWAK JZ. Receptory błonowe a przemiany fosfoinozytydów: Trifosforan inozytolu i diacylglicerol jako drugie przekazywacze informacji. *Kosmos* 1988; **37**: 339–378.
- [40] OOSTERBAAN RA, JANISZ HS. Cholinesterase, esterases and lipases. [w] Florjkin M, Stotz EH red. *Comprehensive Biochemistry*, Vol. 16. Amsterdam: Elsevier Publ. Comp. 1–54.
- [41] PETERS JE, WU PHL, SHARP WR, PADDOCK EF. Rooting and the metabolism of nicotine in tobacco callus cultures. *Physiol Plant* 1974; **31**: 97–100.
- [42] RAINERI M, MODENESI P. Preliminary evidence for a cholinergic-like system in lichen morphogenesis. *Histochem J* 1986; **18**: 647–657.
- [43] ROSHCHINA VV. Action of acetylcholine agonists and antagonists on reactions of photosynthetic membranes. *Photosynthetica* 1987; **21**: 296–300.
- [44] ROSHCHINA VV, MUKHIN EN. Acetylcholinesterase activity in chloroplasts and acetylcholine effects on photochemical reactions. *Photosynthetica* 1985; **19**: 164–171.
- [45] ROSS A, RAQUANO M, PRIVES J. Induction of phosphorylation and cell surface redistribution of acetylcholine receptors by phorbol ester and carbamylcholine in cultured chick muscle cells. *J Cell Biol* 1988; **107**: 1139–1145.
- [46] SASTRY RBV, SADAVONGVIVAD C. Cholinergic system in non-nervous tissues. *Pharmacol Rev* 1979; **30**: 65–132.
- [47] SATTER RL, APPELWHITHE PB, GALSTON AW. Phytochrome-controlled nyctinasty in *Albizia julibrissin*. *Plant Physiol* 1972; **50**: 523–525.
- [48] SAUNDERS JA, McCLURE JW. Acetylcholine inhibition of phytochrome-mediated increase in a flavonoid and in phenyl-alanine ammonia-lyase activity of etiolated barley plumules. *Plant Physiol* 1973; **51**: 407–408.
- [49] SMALLMAN B, MANECKJEE A. The synthesis of acetylcholine by plants. *Biochem J* 1981; **194**: 361–365.
- [50] TANADA TA. On the involvement of acetylcholine in phytochrome action. *Plant Physiol* 1972; **49**: 860–861.
- [51] TORIYAMA H. Observation and experimental studies of the meristem of leguminous plants. I. Effects of acetylcholine, red light and far-red light upon the protoplasts of root tip meristem. *Cytologia* 1972; **43**: 325–337.
- [52] TORIYAMA H, JAFFE MJ. Migration of calcium and its role in the regulation of seismonasty in the motor cell of *Mimosa pudica* L. *Plant Physiol* 1972; **49**: 72–81.
- [53] TRETYN A. Influence of red light and acetylcholine on  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  uptake by oat coleoptile cells. *Cell Biol Int Rep* 1987; **11**: 887–896.
- [54] TRETYN A. Wpływ acetylcholinozyny na wzrost i rozwój roślin. *Post Biol Kom* w druku.
- [55] TRETYN A, KENDRICK RE. Induction of leaf unrolling by phytochrome and acetylcholine in etiolated wheat seedlings. *Photochem Photobiol* w druku.
- [56] TRETYN A, KENDRICK RE. Acetylcholine in plants: presence, metabolism and mechanism of action. *Bot Rev* wysłane do Redakcji.
- [57] TRETYN A, KWIATKOWSKA K. Charakterystyka roślinnego systemu cholinergicznego. Cholinoesterazy roślin. *Post Biol Kom* 1987; **14**: 83–96.
- [58] TRETYN A, TRETYN M. Charakterystyka roślinnego systemu cholinergicznego. Acetylcholina. *Post Biol Kom* 1988; **15**: 447–494.
- [59] TRETYN A, TRETYN M. Diurnal acetylcholine oscillations in green oat seedlings. *Acta Physiol Plant* 1989; **10**: 243–246.
- [60] TRETYN A, TRETYN M. Oscillations of acetylcholine in oat seedlings. *Chronobiologia*, w druku.



- [61] TRETYN A, KENDRICK RE, BOSSEN ME. The effect of a calcium-channel antagonist nifedipine and agonist Bay K-8644 on the phytochrome-controlled swelling of etiolated wheat protoplasts. *Physiol Plant* w druku.
- [62] TRETYN A, BOSSEN ME, KENDRICK RE. The influence of acetylcholine on the swelling of wheat (*Triticum aestivum* L.) protoplasts. *J Plant Physiol* w druku.
- [63] TRETYN A, KENDRICK RE, BOSSEN ME, VREDENBERG WJ. Influence of acetylcholine agonists and antagonists on the swelling of etiolated wheat (*Triticum aestivum* L.) mesophyll protoplasts. *Planta* w druku.
- [64] TRETYN A, KESY J, KOPCEWICZ J. Fitochrom – oczyszczanie, struktura, biosynteza i właściwości molekularne. *Post Biol Kom* 1988; 15: 495–512.
- [65] TRETYN A, KOPCEWICZ J, PAWLAK A. Fitochrom: pierwotny mechanizm działania. *Post Biol Kom* 1990; 1: 1–17.
- [66] TRETYN A, ŚLESIAK E, KWIATKOWSKA K. Cytochemical localization of *AChE* in plant cells in LM/TEM/SEM. *Folia Histochem Cytobiol* 1986; 24: 328–329.
- [67] VERBEEK M, VENDRIG JC. Are acetylcholine-like cotyledon factor involved in the growth of cucumber hypocotyl? *Z Pflanzenphysiol* 1977; 83: 335–340.
- [68] VINER N, WHITELMAN G, SMITH H. Calcium and phytochrome control of leaf unrolling in dark-grown barley seedlings. *Planta* 1988; 175: 209–213.

Otrzymano: 30 listopada 1989 r.

Przyjęto 22 lutego 1990 r.

Adres autora: ul. Gagarina 9, 87-100 Toruń.



# GENETYCZNE ASPEKTY OPORNOŚCI KOMÓREK NOWOTWOROWYCH NA CYTOSTATYKI I. MECHANIZMY OPORNOŚCI NA POJEDYNCZE CYTOSTATYKI

## CANCER CELL RESISTANCE TO CYTOSTATIC DRUGS. GENETIC ASPECTS. I. MECHANISMS OF RESISTANCE TO PARTICULAR CYTOSTATICS

Olga HAUS

Katedra i Zakład Patofizjologii Akademii Medycznej we Wrocławiu

*Streszczenie.* Zasadniczą podstawą oporności komórek nowotworowych na cytostatyki jest ich heterogenność, związana z wysoką częstotliwością spontanicznych mutacji. Leki przeciwnowotworowe działają głównie jako czynnik selekcji pozytywnej niszcząc komórki niezmutowane. Zmianą najczęściej występującą w materiale genetycznym odpornej komórki jest amplifikacja genu enzymu docelowego dla danego cytostatyku. Innymi mechanizmami oporności mającymi podłoże genetyczne są: zaburzenia transportu leku do wnętrza komórki lub nadmierne jego usuwanie, zmniejszenie powinowactwa białek wewnątrzkomórkowych wiążących lek, brak metabolizmu leku niezbędnego do jego aktywacji, wzrost aktywności enzymów reparacyjnych, wzrost aktywności transferaz glutationu.

*Summary.* The main reason of cancer cells resistance to cytostatic drugs is their heterogeneity connected with high frequency of spontaneous mutations in these cells. Cytostatic drugs act mainly as positive selection factors killing unmutated cells. Amplification of genes coding for target enzyme of a drug is the most frequent genetic change in resistant cells. Decreased drug influx to the cell or increased efflux, altered drug binding to intracellular proteins, lack of its intracellular activation, increased activity of DNA repair enzymes, increased activity of glutathione transferases are the other mechanisms of drug resistance based upon genetic changes in neoplastic cells.

Badania oporności komórek nowotworowych na cytostatyki rozwinęły się znacznie w ciągu ostatnich lat w następstwie spostrzeżenia, że zjawisko to jest główną przyczyną niepowodzeń chemioterapii u pacjentów z chorobami nowotworowymi [9]. W ostatnim czasie uwaga badaczy zwróciła się ku genetycznemu podłożu tego zjawiska.

## ZWIĄZEK MIĘDZY GENETYCZNĄ NIESTABILNOŚCIĄ KOMÓREK NOWOTWOROWYCH A NABYTĄ OPORNOŚCIĄ NA CYTOSTATYKI

Matematyczny model powiązań między wrażliwością danej populacji komórek na cytostatyki a częstością spontanicznych mutacji zachodzących w niej został przedstawiony po raz pierwszy przez Goldie i Coldman [25], a następnie potwierdzony i rozszerzony przez inne grupy badaczy [44, 52]. Na podstawie tego modelu opracowano teorię o roli genetycznej niestabilności komórek w rozwoju oporności na cytostatyki [18, 26]. Według tej teorii zasadniczą podstawą nabytej oporności komórek nowotworowych na cytostatyki jest ich heterogenność, związana z wysoką częstością mutacji w komórkach nowotworowych w porównaniu z normalnymi. Jest ona zintegrowana z samym procesem transformacji nowotworowej, w której trakcie rozluźniają się ograniczenia działające w kierunku ochrony normalnej komórki przed ekspresją fenotypowej różnorodności. Informacja powodująca wytworzenie oporności na cytostatyki zawarta jest w genomie prawidłowej komórki, ale zdolność ekspresji tej informacji jest zahamowana. W czasie nowotworowej transformacji komórki zostają uwolnione od mechanizmów hamujących i wykazują wysoki stopień spontanicznych mutacji warunkujących powstawanie różnorodnych nowych cech, m.in. oporności na cytostatyki [18, 56]. Leki przeciwnowotworowe działałyby tu jedynie jako czynnik selekcji pozytywnej, zabijający komórki, w których mutacja nie zaszła. Większość cytostatyków działa ponadto jako czynniki mutagenne, zwiększając w ten sposób częstość przypadkowych zmian także w zakresie oporności [26]. Potwierdzenie faktu spontanicznego powstawania oporności komórek na cytostatyki znaleźć można w wielu opracowaniach, m.in. dotyczących linii opornych na leki alkilujące [59].

### ZABURZENIA WIERNOŚCI REPLIKACJI DNA

Utrata przez komórki nowotworowe wiernego przekazywania informacji genetycznej oraz jej ekspresji związana jest prawdopodobnie z zaburzeniem prawidłowego mechanizmu zapewniającego wierność replikacji DNA. W zdrowych komórkach mechanizm ten polega na zatrzymywaniu konserwatywnego łańcucha DNA w komórkach macierzystych danych linii. Nowosyntetyzowane łańcuchy DNA, mogące zawierać nieprawidłowe sekwencje wynikające z błędnego kopiowania, przekazywane są zróżnicowanym komórkom potomnym i nie stanowią źródła klonów komórkowych z błędną informacją genetyczną. Ta preferencyjna retencja "nieśmiertelnego" łańcucha DNA w komórkach macierzystych utracona zostaje podczas transformacji nowotworowej, w czego następstwie linia komórek macierzystych zyskuje znacznie zwiększoną zdolność do akumulowania błędów kodu genetycznego [14].

## AMPLIFIKACJA DNA JAKO MECHANIZM OPORNOŚCI NA CYTOSTATYKI

Jedną z najczęściej spotykanych zmian warunkujących wytworzenie cechy oporności jest zwielokrotnienie (amplifikacja) genów kodujących poszczególne białka, będące najczęściej enzymami blokowanych przez cytostatyki [4, 22]. Stopień wytworzonej w ten sposób oporności jest najczęściej skorelowany ze stopniem amplifikacji, czyli z liczbą nowopowstałych kopii genu [58]. Spotyka się również oporność powstałą wskutek zwiększonej ekspresji genu, bez jego amplifikacji [41, 70].

Amplifikacja genu jest cechą, która może powstać samoistnie w trakcie replikacji nawet w zdrowych komórkach. W prawidłowych warunkach środowiska wewnętrznego i zewnętrznego, dzięki istnieniu mechanizmów zabezpieczających, zamplifikowane sekwencje DNA są wycinane i kolejne pokolenia komórkowe nie dziedziczą tej cechy. W warunkach selektywnych (np. obecność cytostatyku lub hormonu w podłożu) cecha ta może być preferencyjnie zachowywana i w kolejnych pokoleniach mogą pojawiać się komórki o coraz większym stopniu amplifikacji danego genu [74].

Komórki nowotworowe wykazują genetyczną niestabilność, są więc zdolne również do bardziej intensywnej niż w komórkach prawidłowych spontanicznej amplifikacji różnych genów [26], aczkolwiek niektóre badania nie potwierdzają zachodzenia spontanicznej amplifikacji genów oporności w liniach komórek nowotworowych rosnących w nieselektywnych warunkach [87]. Obecność w środowisku cytostatyku o coraz bardziej wzrastającym stężeniu bądź kolejne przerywane ekspozycje na dany cytostatyk stanowią czynnik selekcji korzystnej dla komórek o coraz większym stopniu amplifikacji genu "odpowiedzialnego" za oporność na ten cytostatyk [60].

### MECHANIZMY AMPLIFIKACJI DNA

Amplifikacja DNA w komórkach opornych zależy głównie od dwóch mechanizmów:

- niesymetrycznej wymiany chromatyd siostrzanych (SCE) [87] oraz
- nieproporcjonalnej replikacji [73].

Wiadomo, że niektóre cytostatyki, działając jako mutageny, zwiększają częstość wymian chromatyd siostrzanych. Jeśli nawet niewielka ich część zachodzi niesymetrycznie w pobliżu locus genu odpowiedzialnego za dany typ oporności, może to spowodować podwojenie liczby kopii danego genu w jednym z chromosomów homologicznych, a brak w drugim [30]. Mechanizm ten uważany jest jednak za wtórny w stosunku do już istniejącej amplifikacji spowodowanej nieproporcjonalną replikacją.

Teoria nieproporcjonalnej replikacji powstała na podstawie modelu amplifikacji DNA wirusowego [46] i DNA muszki owocowej *Drosophila melanogaster* [85], tzw. *onion skin model*, w którym poszczególne kopie zamplifikowanych odcinków DNA układają się obok siebie analogicznie do układu łusek cebuli [30]. Amplifikacja genów u *Drosophila* polega na rozwoju kontrolowanym procesie, który powoduje powtarzanie replikacji (*overreplication*) niewielkich odcinków genomu [85]. Teoria ta, w zastosowaniu do komórek ssaków hodowanych w środowisku zawierającym cytostatyki, zakłada, że miejsca inicjacji replikacji zostają całkowicie zablokowane przez inhibitory syntezy DNA lub środki czasowo przerywające ciągłość nici DNA. Czynniki te mogą być cytostatyki bądź środki wspomagające, będące również inhibitorami, jak np. hydroksymocznik (*HU*). Ta blokada

powoduje zaburzenie systemu kontroli replikacji DNA i indukcję ponownej replikacji w ciągu tego samego cyklu komórkowego [30, 49]. Analogiczne zjawisko obserwuje się w przypadku wirusa SV<sub>40</sub> zintegrowanego z genomem komórki.

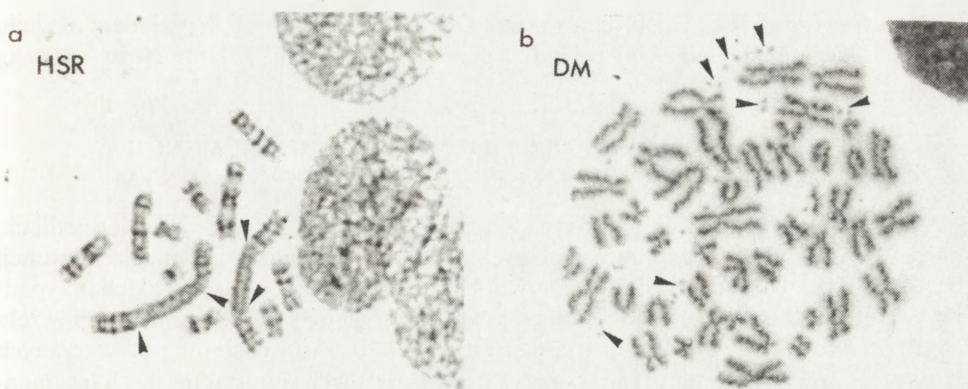
Do czynników, które w ten sposób inicjują lub wspomagają amplifikację, należą m.in. metotreksat (*MTX*) [75], arabinozyd cytozyny (*ARA-C*) [73], hydroksymocznik (*HU*) [49], promieniowanie ultrafioletowe [73], promieniowanie gamma [77], ester forbolu (*TPA*) [8], hormony stymulujące wzrost oraz naskórkowy czynnik wzrostu (*epidermal growth factor* = *EGF*) [8].

Teoria ta nie tłumaczy jednak całego mechanizmu amplifikacji w komórkach opornych. Ponadto udowodniono, że niektóre z wyżej wymienionych czynników (np. *HU*) nie blokują całkowicie miejsc replikacji DNA (*DNA-growing points*) oraz że nadmierna replikacja (*overreplication*) nie zachodzi w pojedynczym cyklu komórkowym ssaków [30]. Inny model działania czynników sprzyjających amplifikacji podaje Hahn [30]: cytostatyki działają analogicznie do mutagenów, powodując powstanie wielu aberacji chromosomalnych [75]. Po mitozie nieprawidłowe fragmenty chromosomu zawierające dany (odpowiedzialny za oporność) gen mogą przypadkowo segregować z niezmiennym chromosomem zawierającym dany gen, co w rezultacie daje komórkę z trzema zamiast z dwiema kopiami genu. Niektóre geny zlokalizowane w obrębie fragmentów chromosomowych wyindukowanych przez cytostatyki mogą być zachowywane w sposób niestały i często amplifikowane mogą też później być na stałe wbudowywane w obręb genomu [43]. Selektywne warunki środowiska działając następnie korzystnie dla komórek z więcej niż jedną kopią genu wzmagają stopień jego amplifikacji.

#### MORFOLOGICZNE WYKŁADNIKI AMPLIFIKACJI DNA NA POZIOMIE CHROMOSOMALNYM

Amplifikacja genów może być dostrzegana jedynie na poziomie submikroskopowym [74], może też mieć swój morfologiczny wykładnik w postaci widocznych w mikroskopie zmian w strukturze chromatyny. Zamplifikowane sekwencje mogą występować w obrębie chromosomów lub pozachromosomalnie [73, 75]. Lokalizacja struktur zamplifikowanych w obrębie chromosomu nie zawsze pokrywa się z pierwotną lokalizacją danego genu, mogą one znajdować się na zupełnie innych chromosomach niż pierwotny, i to bez widocznej w mikroskopie jakiegokolwiek translokacji dotyczącej innego fragmentu danego "matczyngo" chromosomu [74]. Morfologicznym odpowiednikiem sekwencji zamplifikowanych w obrębie chromosomu są najczęściej regiony barwiące się jednorodnie (*HSR* = *homogeneously staining regions*), czyli regiony, które nie mają poprzecznego prążkowania charakterystycznego dla chromosomów wybarwianych jedną z rutynowo stosowanych technik prążkowych (rys. 1a). Innymi śródchromosomalnymi odpowiednikami amplifikacji genów są np. tzw. regiony o nieprawidłowym prążkowaniu (*ABR* = *abnormally banding regions*) [10].

Pozachromosomalną postacią sekwencji zamplifikowanych są małe, acentryczne, jednorodne, najczęściej podwójne odcinki chromatyny (*DMs* = *double minute chromosomes*), replikujące w cyklu komórkowym [5, 7] (rys. 1b). *DMs* replikują tylko jeden raz podczas fazy S, proporcjonalnie do chromosomów, natomiast nie ulegają analogicznemu rozdziałowi w anafazie [7]. Ze względu na to, że *DMs* nie mają centromerów i nie przylączają się do nici wrzeciona podziałowego, mogą być w trakcie mitozy rozdzielane



RYS. 1. Cytologiczne wykładniki amplifikacji DNA: a) regiony barwiące się jednorodnie (*homogeneously staining regions* = *HSR*); fragment mitozy (materiał własny); b) acentryczne, podwójne niewielkie odcinki chromatyny położone pozachromosomalnie (*double minute chromosomes* = *DMs*) (materiał własny)

nierównomiernie do komórek potomnych, mogą również podlegać mikronukleacji tworząc materiał pozajądrowy, który może być szybko tracony w nieselektywnych warunkach środowiska [7, 74]. Według niektórych autorów obie morfologiczne formy amplifikacji mogą w pewnych warunkach (np. pasaż przez zwierzęta, hodowla ze stałą obecnością lub brakiem cytostatyku w podłożu) przechodzić w siebie nawzajem [5], według innych wewnątrzchromosomowe sekwencje zamplifikowane nie mogą być prekursorami elementów pozachromosomowych [90], które powstają niezależnie w selektywnych warunkach środowiska, poprzez amplifikację mniejszych pozachromosomowych elementów. *HSR* są charakterystyczne dla linii komórkowych o stałej oporności utrzymującej się nawet w środowisku nieselektywnym [10, 12, 33], *DM* zaś dla oporności niestałej, utrzymującej się jedynie w obecności cytostatyku w środowisku [5].

Stosując metodę hybrydyzacji *in situ* [32] wykazano, że *HSR* i *DM* stanowią rzeczywiście cytologiczne odzwierciedlenie zamplifikowanych sekwencji DNA [89].

Obecność tych struktur stwierdzono nie tylko w liniach komórek opornych hodowanych *in vitro* [23, 33], lecz również w komórkach pacjentów cechujących się opornością na dany lek [15, 35].

#### AMPLIFIKACJA ONKOGENÓW W KOMÓRKACH NOWOTWOROWYCH

Amplifikacja genów w komórkach nowotworowych może być nie tylko wyrazem ich oporności na cytostatyki, lecz również zjawiskiem nierozłącznie związanym z samym procesem transformacji nowotworowej, obecnym od początku lub pojawiającym się w trakcie rozwoju nowotworu [50]. W wielu nowotworach, nigdy nie ekspozowanych na działanie cytostatyków, stwierdza się również obecność sekwencji zamplifikowanych, przy czym amplifikacja dotyczy tutaj genów odpowiedzialnych prawdopodobnie za transfor-

mację nowotworową lub progresję nowotworu, czyli onkogenów [1]. Przykładem może tu być amplifikacja onkogenu *N-myc* w ludzkich neuroblastomach [13], czy *N-ras* – w raku sutka [28].

### METODY WYKRYWANIA I IDENTYFIKACJI SEKWENCJI ZAMPLIFIKOWANYCH NA POZIOMIE MOLEKULARNYM

Wykrycie sekwencji zamplifikowanych, gdy mają one cytogenetyczne odzwierciedlenie w postaci *HSR* lub *DM*, nie sprawia większych trudności. Natomiast ujawnienie sekwencji zawierających niewielką liczbę kopii genu jest bardziej skomplikowane. W takich przypadkach znajduje zastosowanie opracowana przez Roninsona [63] metoda renaturacji w żelu (*in-gel renaturation*). Polega ona na denaturacji DNA *in situ* i następnie powtarzanych kilkakrotnie procesach renaturacji i denaturacji znakowanych i nieznakowanych fragmentów restrykcyjnych rozdzielonych w żelu agarozowym. Sekwencje zamplifikowane ujawniają się w postaci licznych nowych prążków nieobecnych w prawidłowym diploidalnym DNA. Metoda ta pozwala nie tylko na wykrycie sekwencji obecnych nawet w mniej niż 15 kopiach lub na potwierdzenie obecności struktur zamplifikowanych, przewidywanej na podstawie badań cytogenetycznych. Można również dzięki niej określić wielkość i strukturę zamplifikowanej sekwencji [50] bez żadnej poprzedniej wiedzy o jej naturze.

Identyfikacja takiej sekwencji możliwa jest przy zastosowaniu techniki hybrydyzacji DNA metodą Southern [84] (*Southern blot hybridization*). W przypadku analizowania komórek opornych, stosuje się znakowane sondy DNA odpowiadające "genom oporności".

Podjmuje się także próby identyfikacji genu o wysokim stopniu amplifikacji, nawet gdy nie wykazuje on homologii (nie hybryduje) z żadną z dostępnych sond DNA. W takiej sytuacji stosuje się metodę klonowania DNA, opracowaną przez Maniatisa i wsp. [48], która w przypadku analizy struktur zamplifikowanych jest znacznie ułatwiona poprzez zwiększoną już *a priori* liczbę kopii badanego genu [50].

Natomiast w celu wykrywania sekwencji o bardzo niskim stopniu amplifikacji, niewykrywalnym metodą denaturacji w żelu (jedynie kilka kopii genu) i w celu wykrywania zwiększonej ekspresji genu "oporności" (wyrażonej wzrostem transkryptu) bez jego amplifikacji, zastosowano niedawno opracowaną metodę łańcuchowej reakcji polimerazy (*polymerase chain reaction = PCR*) [41, 72].

### INNE MECHANIZMY OPORNOŚCI KOMÓREK NOWOTWOROWYCH

Amplifikacja genów enzymów docelowych dla indywidualnych cytostatyków (lub zwiększona ich ekspresja bez amplifikacji) jest najczęściej spotykanym, ale nie jedynym mechanizmem oporności. Zmiany ekspresji genów stanowią również podłoże innych mechanizmów, takich jak:

- zaburzenie transportu leku do wnętrza komórki lub nadmierne jego usuwanie [24, 53, 71],
- zmniejszenie powinowactwa białek wewnątrzkomórkowych wiążących lek [79],



● brak metabolizmu leku, niezbędnego do jego aktywacji [19, 36], zmiana ta może zależeć od mutacji genu kodującego enzym aktywujący lek; gen taki, w odróżnieniu od omówionych wyżej "genów oporności", określić można jako "gen wrażliwości" na dany cytostatyk [36],

- wzrost aktywności enzymów reparacyjnych – w przypadku leków alkilujących [45],
- wzrost aktywności transferaz glutationu i innych enzymów o działaniu detoksykacyjnym [47, 91],
- zmiany aktywności topoizomerazy II [38, 67],
- inne.

Podłożem oporności przeciw danemu cytostatykowi może być jednocześnie kilka mechanizmów, przy czym każdy z nich uwarunkowany jest zwiększeniem ekspresji odpowiednich genów, co nawet bez ich amplifikacji wystarcza do zapewnienia niskiego stopnia oporności [58]. Natomiast oporność wysokiego stopnia skojarzona jest przeważnie ze zwiększeniem liczby kopii danego genu.

## PRZYKŁADY MECHANIZMÓW OPORNOŚCI KOMÓREK NOWOTWOROWYCH NA POSZCZEGÓLNE CYTOSTATYKI

Poniżej przedstawiono kilka przykładów procesów zachodzących w komórkach nowotworowych, prowadzących do ich oporności na dany cytostatyk lub grupę cytostatyków. Lista ta nie jest oczywiście kompletna; nie uwzględnia wszystkich grup leków przeciwnowotworowych ani wszystkich mechanizmów prowadzących do wytworzenia oporności.

### METOTREKSAT

Metotreksat (*MTX*) stanowi bardzo dobry obiekt do badania nabytej oporności komórek na cytostatyki ze względu na stosunkowo prosty i od dawna znany mechanizm działania oraz niewielką ilość zmian metabolicznych, którym podlega we wnętrzu komórki (poliglutaminacja) [9].

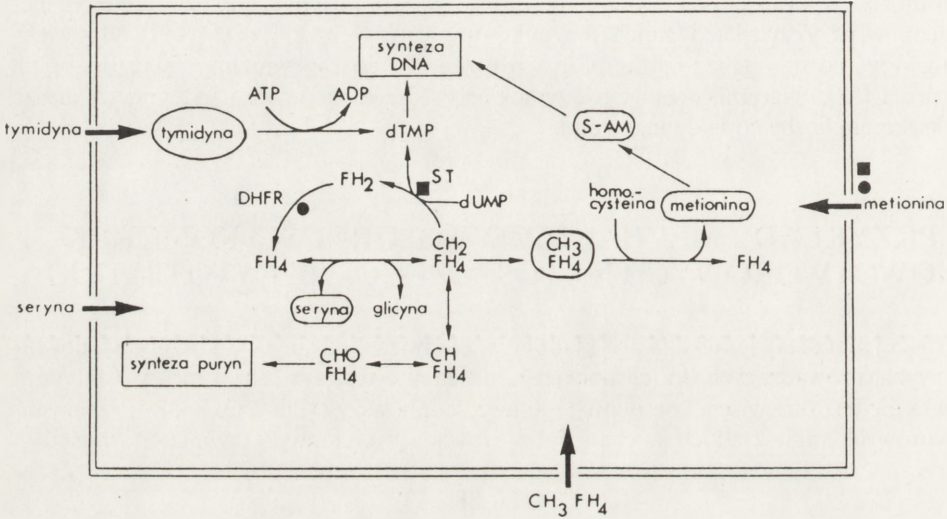
Głównym efektem działania *MTX* jest zahamowanie enzymu reduktazy dwuhydrofolianowej (*DHFR*), przez co zostaje zaburzona reakcja tworzenia tetrahydrofolianu z dwuhydrofolianu, a co za tym idzie również synteza puryn (rys. 2). Zwiększenie aktywności *DHFR*, np. wskutek amplifikacji, pozwala na przełamanie bloku spowodowanego przez *MTX* i kontynuację wymienionych procesów metabolicznych.

Amplifikacja genu *DHFR* jest dawno już poznanym mechanizmem oporności na *MTX* występującym zarówno w ludzkich [9, 54, 86] i zwierzęcych [10, 11, 75] liniach komórkowych, jak i w komórkach pacjentów opornych na leczenie tym lekiem [15, 35, 89]. *MTX* działa tu prawdopodobnie nie tylko jako czynnik selekcji, ale i czynnik nasilający amplifikację poprzez czasowe przerywanie ciągłości nici DNA w fazie S [49]. Stopień amplifikacji genu *DHFR* był w każdym przeanalizowanym pod tym kątem przypadku proporcjonalny do wzrostu aktywności enzymu [9, 54, 86, 92].

Cytologicznym wyrazem tej amplifikacji może być obecność zarówno *HSR*, jak i *DM* [73]. Gen *DHFR* zlokalizowany jest u człowieka na chromosomie 5 [2]. W niektórych przypadkach linii opornych stwierdzono obecność *HSR* w obrębie tego właśnie chromo-

somu [86], podczas gdy w innych *HSR* zlokalizowany był w innym miejscu genomu [92], co zgodne jest z uprzednio wspomnianym spostrzeżeniem Schimke [74] o zmiennej lokalizacji *HSR*, niekoniecznie związanej z pierwotną lokalizacją zwielokrotnionego genu.

Podobnym mechanizmem charakteryzuje się również oporność na wiele innych cytotatyków, np. 5-fluorouracyl [68], dezoksykoformiczną (pentostatynę) [93], PALA (albizynę) [4]. Enzymami, których geny ulegają amplifikacji, są tu odpowiednio: syntetaza tymidylanowa, dezaminaza adenozyliny i transkarbamyłaza asparaginianowa.



Rys. 2. Schemat metabolizmu folianów z uwzględnieniem punktów uchwytu metotreksatu (*MTX*) i cisplatyny (*CP*); legenda: *S-AM* = S-adenozylometionina, *dTMP* = tymidynomonofosforan,  $FH_2$  = dwohydrofolian,  $FH_4$  = tetrahydrofolian, *DHFR* = reduktaza dwohydrofolianowa, *ST* = syntetaza tymidylanowa; czarne kółko wskazuje punkty uchwytu *MTX*, kwadrat – punkty uchwytu *CP* (wg [70])

Innymi mechanizmami oporności na *MTX*, występującymi jednak rzadziej niż amplifikacja DNA, są:

1) nieprawidłowy, zmniejszony transport *MTX* do wnętrza komórki zależny od zaburzenia indywidualnego mechanizmu transportu folianów przez błonę komórkową [81] i nie powodujący krzyżowej oporności na inne cytostatyki [53];

2) obecność nieprawidłowych cząsteczek *DHFR*, wykazujących zmniejszone powinowactwo do *MTX* [79];

3) zaburzenie wewnątrzkomórkowego metabolizmu *MTX* wyrażające się zmniejszonym tworzeniem poliglutaminianów *MTX* [17, 19];

4) wzrost endogennej produkcji metioniny zależny od zwiększenia puli tetrahydrofolianów (rys. 3) [71].

Jednym z mechanizmów działania *MTX* jest hamowanie aktywnego transportu metioniny i innych aminokwasów do komórki. Komórki nowotworowe mają większe od komórek prawidłowych zapotrzebowanie na metioninę [34]. Stają się one odporne na *MTX* niezależniąc się od dopływu egzogennej metioniny przez zwiększenie jej endogennej wyt-

warzania. W przypadku tego typu oporności stwierdza się również wzrost aktywności *DHFR*, zależny jednak tylko od zwiększania ekspresji genu *DHFR*, bez jego amplifikacji [71]. Natomiast aktywność syntetazy tymidylanowej ulega obniżeniu (rys. 3). Komórki takie wykazują krzyżową oporność na cis-platynę [88] zależną od wspólnego punktu uchwytu dla *MTX* i cis-platyny, jakim jest cykl syntetazy tymidylanowej.

### INNE ANTYMETABOLITY

Oporność na tioguaninę (*TG*) związana jest z brakiem prawidłowej aktywacji tego leku spowodowanym mutacją genu kodującego enzym aktywujący *TG* (fosforybozylotransferaza: hypoksantyna-guanina = *HGPRT*) [36, 95]. Oporność na 5-fluorouracyl (*5-FU*) i 5-fluorodezoksyurydynam (*5-FUdR*) zależy od amplifikacji genu syntetazy tymidylanowej – enzymu docelowego dla tych cytostatyków (rys. 2) [70].

Uniezależnienie się komórek od dostawy aminokwasów egzogennych poprzez zwiększoną produkcję własną stanowi jeden z mechanizmów oporności przeciwko tym wszystkim antymetabolitom, które podobnie jak *MTX* hamują zależny od pompy sodowej transport aminokwasów do komórki [70].

### LEKI ALKILUJĄCE

Zasadniczym mechanizmem działania leków alkilujących jest przyłączanie się do łańcucha DNA [20] i powodowanie powstawania nieprawidłowych wiązań pomiędzy zasadami w obrębie pojedynczego łańcucha, pomiędzy dwoma łańcuchami lub pomiędzy DNA a białkiem [10, 69]. Takie zaburzenia w strukturze DNA sprzyjają powstawaniu aberracji chromosomalnych, które mogą być letalne dla komórki [83].

Główny mechanizm spontanicznej i nabytej oporności na te leki polega na szybkiej naprawie nieprawidłowych połączeń przez zwiększenie aktywności enzymów reparacyjnych [69]. W badaniach nad monofunkcyjnymi lekami alkilującymi udowodniono, że oporność tę można zredukować stosując inhibitory syntezy białek, natomiast inhibitory syntezy DNA nie odgrywają tu roli [83]. Świadczyłoby to o roli zwiększonej transkrypcji, translacji albo wręcz o udziale czynników epigenetycznych, a nie amplifikacji genów w powstawaniu tego typu oporności, przynajmniej na niektóre z leków alkilujących. Natomiast w badaniach linii opornych na chlorozotocynę, jeden z chloroetylonitrozomoczników, stwierdzono występowanie cytogenetycznych wykładników amplifikacji DNA w postaci *HSR* [33], co jest sprzeczne z powyższym wnioskiem. Prawdopodobnie więc oba mechanizmy odgrywają rolę w powstawaniu oporności, zmieniając się w zależności od stosowanego leku lub rodzaju badanych komórek.

W badaniach nad innymi pochodnymi chloroetylonitrozomocznika [69] zidentyfikowano enzym reparacyjny, którego zwiększona aktywność odgrywała rolę w oporności komórek na te leki. Była nim metylotransferaza-0<sup>6</sup>-metyloguaninanowa, która wypiera grupy chloroetylowe z połączeń z guaniną w pozycji 0<sup>6</sup>. Wiązanie z guaniną w pozycji 0<sup>6</sup> i tworzenie krzyżowych wiązań pomiędzy łańcuchami DNA jest jednym z mechanizmów działania tej grupy leków [61].

Jednym z najsilniej działających leków alkilujących jest cisplatylna, która oprócz tworzenia różnego typu połączeń z DNA [20, 64], zmieniających się w zależności od rodzaju nowotworu [69], ma również inne mechanizmy działania; m.in. zaburza aktywny transport metioniny do komórki [29, 78]. Mechanizm oporności komórek nowotworowych na cis-

platynę również nie jest jednorodny. Większość komórek reaguje wzrostem aktywności enzymów naprawczych [20], w innych stwierdzono wzrost poziomu glutationu (*GSH*) [31, 37, 51] bądź wzrost zależnej od folianów endogennej produkcji metioniny [78] lub nawet – w późniejszym okresie rozwoju oporności – zaburzenia w transporcie aminokwasów prowadzące do uniezależnienia się od cisplatyny [78].

Oporność na cisplatynę rozwija się szybko [64], ale rzadko, zwłaszcza w liniach nowotworów ludzkich, występuje jako stała oporność na jeden cytostatyk [23]. Nie stwierdzono krzyżowej oporności z innymi środkami alkilującymi, natomiast często występuje ona dla antymetabolitów kwasu foliowego i fluoropirymidyn [71, 88]. Wspólnym punktem uchwytu, oprócz transportu aminokwasów przez błonę komórkową [71], okazały się tu enzymy cyklu syntetazy tymidylanowej (rys. 2), których zwiększona aktywność odpowiada za niektóre przynajmniej przypadki oporności na te leki [70].

Wzrost ekspresji samej syntetazy tymidylanowej w powiązaniu lub nie z amplifikacją jej genu stwierdzono też w wielu komórkach opornych jedynie na cisplatynę [41, 72].

W niektórych liniach komórkowych opornych na cisplatynę stwierdzono wzrost poziomu glutationu [31, 37, 51], który reagując z cząsteczką cisplatyny połączoną jednym wiązaniem z DNA (*monoadduct*) zapobiega tworzeniu trwalszych połączeń (*diadducts*) i przyspiesza likwidację już istniejących wiązań [51]. Obniżenie poziomu glutationu zmniejszyło stopień oporności w tych liniach aż do całkowitego jej zniesienia [31, 37]. Zjawiska tego nie stwierdzono w innych liniach o wysokim poziomie *GSH* [3], cechujących się prawdopodobnie innym mechanizmem oporności.

W rozwoju oporności na niektóre inne środki alkilujące (melfalan, mitomycyna C) odgrywa rolę zmniejszenie przepuszczalności błony komórkowej dla tych leków [70]. Mechanizm ten nie jest jednak prawdopodobnie odpowiedzialny za żaden z tych typów oporności na cisplatynę [78].

W badaniach *in vitro* otrzymywano komórki wykazujące jednoczesną oporność na kilka leków alkilujących [76] poprzez fuzję komórek opornych na poszczególne leki. W badaniach na zwierzętach laboratoryjnych nie potwierdzono jednak istnienia takiego mechanizmu powstawania oporności wielolekowej, przynajmniej dla leków alkilujących.

## ANTRACYKLINY

Działanie antracyklin wynika z ich wbudowywania się w łańcuch DNA, co powoduje złamanie i nieprawidłowe połączenia w jego obrębie i w rezultacie blokuje syntezę DNA, RNA i białek [42]. Większość swych działań antracykliny wywierają po przekształceniu przez mikrosomalną reduktazę P450 w formę aktywną – wolne rodniki semichinonu [55].

Oporność na antracykliny występuje przeważnie w połączeniu z opornością na szereg innych leków i uwarunkowana jest głównie aktywnym usuwaniem leków z komórki [58]. Ten typ oporności, określanej jako oporność wielolekowa, omówiony zostanie w II części artykułu. Stwierdzono również istnienie indywidualnego dla antracyklin mechanizmu aktywnego wydalania połączonego z syntezą specyficznej glikoproteiny błonowej i amplifikacją określonych sekwencji DNA, różnych od genów oporności wielolekowej [82, 94]. W komórkach, które rozwinęły tego typu oporność, stwierdza się często istnienie cytologicznych wykładników amplifikacji w postaci *HSR* lub *DM* [82]. W innych komórkach oporność związana jest ze zmniejszeniem biernego wchłaniania antracyklin do komórki [94] lub zmniejszeniem ich wiązania ze strukturami wewnątrzkomórkowymi. Jeszcze inny mecha-

nizm oporności na antracykliny związany jest z ich działaniem poprzez wolne rodniki – w liniach opornych defekt reduktazy P450 może zahamować aktywację antracyklin i tworzenie nadtlenków [42, 55, 80].

W innych badaniach wykazano natomiast, że za indywidualną oporność na antracykliny odpowiedzialna jest głównie aktywna reparacja DNA [94]. Ponadto stwierdza się wyjściowe różnice w indukcji uszkodzeń DNA oraz zmienione proporcje pomiędzy bardziej (w liniach wrażliwych) lub mniej (w liniach opornych) rozpowszechnionymi letalnymi uszkodzeniami DNA [94]. Przewaga jednych mechanizmów oporności nad innymi obserwowana w poszczególnych badaniach może być spowodowana różnymi warunkami powstawania oporności, wyjściowymi cechami komórek lub wreszcie różnymi warunkami przeprowadzania eksperymentu.

## PODSUMOWANIE. PRÓBY PRZEŁAMYWANIA OPORNOŚCI KOMÓREK NOWOTWOROWYCH NA CYTOSTATYKI

Bezpośrednim dowodem genetycznego podłoża oporności komórek nowotworowych na cytostatyki jest możliwość przekazania fenotypu oporności poprzez transfekcję sekwencji DNA uważanych za "geny oporności" z komórek opornych do wrażliwych. Takie eksperymenty przeprowadzono po raz pierwszy ze zamplifikowanymi genami *DHFR* [6, 16]. Komórki wrażliwe, które wbudowały zwiokrotniony gen *DHFR*, zdolne były do jego ekspresji w postaci nadmiernej produkcji *DHFR* prowadzącej do przełamania bloku spowodowanego przez *MTX*. Wszczepione DNA replikowało w każdym cyklu komórkowym i fenotyp oporności stał się stałą cechą tych komórek.

Niejako odwróceniem tego procesu jest transfekcja "genu wrażliwości", czyli genu kodującego enzym niezbędny do aktywacji cytostatyku, z komórek wrażliwych do opornych i w ten sposób "uwrażliwienie" tych komórek na działający lek. Przykładem może tu być transfekcja genu *HGPRT* do komórek opornych na 6-tioguaninę (*6-TG*) [36]. Badania takie przeprowadzono jak dotychczas tylko *in vitro* uzyskując bardzo dobre efekty. Być może metoda ta okaże się również skuteczna w terapii pacjentów opornych na *6-TG*.

Jest to jeden tylko z przykładów przełamania oporności komórek nowotworowych na leki cytostatyczne. Inne próby, których stosowanie oparto na mechanizmie powstawania danego typu oporności, obejmują m.in.:

- zastępowanie danego leku innymi lekami z danej grupy, mającymi inny mechanizm transportu, np. trimetreksat (*TMQ*) zamiast *MTX* [53] lub idarubicyny zamiast dokсорubicyny [94];
- podawanie substancji ułatwiających transport leku przez błonę komórkową, np. wielonienasyconych kwasów tłuszczowych, które ułatwiają bierną dyfuzję antracyklin do wnętrza komórki [94];
- w przypadku zwiększonego wydalania leku z komórki stosowanie leków blokujących kanały wapniowe: np. werapamilu [27, 66] czy nifedypiny [57] lub inhibitorów kalmoduliny [65];

- podawanie leków działających synergistycznie, np. łączne stosowanie cisplatyny i 5-fluorouracylu; cisplatyna zwiększa pulę wewnątrzkomórkową folianów, co z kolei wzmacnia cytotoksyczność FU [70, 78];

- w przypadku oporności związanej z wysokim poziomem *GSH* (np. oporność na cisplatynę) obniżanie tego poziomu przez stosowanie inhibitorów enzymów cyklu glutationu [37, 91].

Większość prób przełamывania oporności stosowana jest dotychczas *in vitro* lub na zwierzętach doświadczalnych. Jedynie część z nich sprawdziła się już w praktyce klinicznej [94] wpływając na zwiększenie skuteczności terapii.

Ważnym problemem przed podjęciem decyzji o zastosowaniu danego schematu leczenia jest również określenie *a priori* oporności lub wrażliwości komórek nowotworowych pacjenta na dany lek. Badania te przeprowadzać można różnymi metodami, przy czym najbardziej uniwersalną z nich jest test tworzenia kolonii komórek nowotworowych (*human tumor clonogenic assay*) przydatny zwłaszcza do oceny chemiooporności [40, 59]. Mniej czasochłonną metodą jest badanie żywotności komórek po zadziałaniu cytostatyku np. kolorymetrycznym testem *MTT* (bromek tetrazolu) lub badanie wbudowywania znakowanej tymidyny czy urydyny w komórkach poddanych działaniu cytostatyku [21]. W specyficznych testach oporności lub wrażliwości na poszczególne cytostatyki wykorzystać można ich mechanizm działania, np. oceniając wrażliwość na leki alkilujące można badać aktywność enzymów reparacyjnych [45] (np.  $0^6$  metylotransferazy – w przypadku chloroetylnitrozomoczników). W przypadku leków uszkadzających łańcuch DNA można, określając stopień tworzenia nieprawidłowych połączeń i ich rodzaj, oceniać cytotoksyczność tych leków w stosunku do danych komórek [69, 94]. W przypadku cisplatyny, oprócz wyżej wymienionych stosowanych metod, określać można również aktywność enzymów cyklu syntetazy tymidyłanowej albo wykorzystywanie egzogennej metioniny przez komórki nowotworowe [70].

Testem oceniającym skuteczność wielu różnych grup cytostatyków jest określenie wyjściowego poziomu glutationu (*GSH*) w komórkach nowotworowych [47]. Do wykrywania oporności na poszczególne cytostatyki związanej z amplifikacją "genów oporności" lub jedynie z ich zwiększoną ekspresją zastosowano już w niektórych ośrodkach wspomniane wyżej metody genetyki molekularnej – renaturacji w żelu [50, 63] i reakcji łańcuchowej polimerazy [71]. Ta druga metoda pozwala na wczesne wykrywanie rozwijającej się oporności, co daje szansę szybkiej zmiany stosowanych leków i uniknięcia długiej, nieefektywnej chemioterapii [72].

Niektóre z powyżej przedstawionych testów znajdują zastosowanie w praktyce klinicznej. Jednak dopiero znając dokładnie wszystkie mechanizmy oporności komórek nowotworowych można będzie z prawie całkowitą pewnością ustalać indywidualną, skuteczną terapię dla każdego pacjenta i modyfikować ją w razie wytworzenia oporności na dotychczas stosowane leki.

## PIŚMIENNICTWO

- [1] ALITALO K, SCHWAB M. Oncogene amplification in tumor cells. *Adv Cancer Res* 1986; **47**: 235–281.
- [2] ANAGOUP NP, O'BRIEN SJ, SHIMADA T, NASH WG, CHEN HJ, NIENHUIS AW. Chromosomal organization of the human dihydrofolate reductase genes: dispersion, selective amplification and a novel form of polymorphism. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984; **81**: 5170–5174.
- [3] ANDREWS PA, MURPHY MP, HOWELL SB. Differential potentiation of alkylating and platinating agent cytotoxicity in human ovarian carcinoma cells by glutathione depletion. *Cancer Res* 1985; **45**: 6250–6253.
- [4] ANDRULIS IL, SIMINOVITCH L. Amplification of the gene for asparagine synthetase. [w] . RT Schimke red. Gene amplification. New York: Cold Spring Harbor Laboratory 1982: 75–80.
- [5] BALABAN-MALENBAUM G, GILBERT F. The proposed origin of double minutes from homogeneously staining region (HSR) – marker chromosomes in human neuroblastoma hybrid cell lines. *Cancer Genet Cytogenet* 1980; **2**: 339–348.
- [6] BAR-ELI M, STANG HD, MERCOLA KE, CLINE MJ. Expression of a methotrexate-resistant dihydrofolate reductase gene by transformed hematopoietic cells of mice. *Somat Cell Genet* 1983; **9**: 55–67.
- [7] BARKER PE. Double minutes in human tumor cells. *Cancer Genet Cytogenet* 1982; **5**: 81–94.
- [8] BARSOUN J, VARSHAVSKY A. Mitogenic hormones and tumor promoters increase the incidence of colony-forming cells bearing amplified dihydrofolate reductase genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983; **80**: 5330–5334.
- [9] BERTINO JR., SRIMATKANDADA S, CARMEN MD, MINI E, JASTREBOFF M, MOROSON BA, DUBE SK. Mechanisms of drug resistance in human leukemia. [w] Neth, Gallo, Greaves, Janka red. Haematology and Blood Transfusion. Vol. 29, Modern Trends in Human Leukemia VI. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag 1985: 90–95.
- [10] BIEDLER JL, MELERA PW, SPENGLER BA. Chromosome abnormalities and gene amplification: comparison of antifolate-resistant and human neuroblastoma cell systems, [w] JD Rowley red. Chromosomes and cancer. From molecules to man. New York: Academic Press 1983: 117–138.
- [11] BIEDLER JL, SPENGLER BA. Metaphase chromosome anomaly: Association with drug resistance and cell-specific products. *Science* 1976; **191**: 185–187.
- [12] BRIEUX de SALOUM S, SLAVUTSKY J, BESUSCHIOS, PAVLOVSKY A A. Homogeneously staining regions (HSR) in a human malignant melanoma. *Cancer Genet Cytogenet* 1984; **11**: 53–60.
- [13] BRODEUR GM, SEEGER RC. Gene amplification in human neuroblastomas: Basic mechanisms and clinical implications. *Cancer Genet Cytogenet* 1986; **19**: 101–111.
- [14] CAIRNS J. Mutation, selection and the natural history of cancer. *Nature* 1975; **225**: 197–201.
- [15] CARMAN MD, SCHORNAGEL JH, RIVEST RS, SRIMATKANDADA S, PORTLOCK CS, BERTINO JR. Resistance to methotrexate due to gene amplification in a patients with acute leukemia. *J Clin Oncol* 1984; **2**: 16–20.
- [16] CARR F, MEDIANA WD, DUBE S, BERTINO JR. Genetic transformation of murine bone marrow cells to methotrexate resistance. *Blood* 1985; **62**: 180–185.
- [17] COWAN KH, JOLIVET J. A methotrexate resistant human breast cancer cell line with multiple defects, including diminished formation of methotrexate polyglutamates. *J Biol Chem* 1984; **259**: 10798–10800.
- [18] DEXTER DL, LEITH JT. Tumor heterogeneity and drug resistance. *J Clin Oncol* 1986; **4**: 244–257.
- [19] DIDDENS H. Resistance to antifolates. IV European Conference on Clinical Oncology and Cancer Nursing, Madrid 1987, abstracts, str. 325.
- [20] FICHTINGER-SCHEPMAN AMJ, DIJT FJ, BEDFORD P, HILL BT, JONG de WH, BERENDS F. Cisplatinum adducts and drug resistance. IV European Conference on Clinical Oncology and Cancer Nursing, Madrid 1987, abstracts, str. 325.
- [21] FORD CHJ, RICHARDSON VJ, TSALTAS G. Comparison of tetrazolium colorimetric and 3H-uridine assays for in vitro chemosensitivity testing. *Cancer Chemother Pharmacol* 1989; **24**: 295–301.
- [22] FOUGERE-DESCHATRETTE C, SCHIMKE RT, WEIL D, WEISS MC. A study of chromosomal changes associated with amplified dihydrofolate reductase genes in rat hepatoma cells and their dedifferentiated variants. *J Cell Biol* 1984; **99**: 497–502.
- [23] FREI E, CUCCHI CA, ROSOVSKY A, TANTRAVAHU R, BERNAL S, ENIA TJ, RUPRECHT RM, HASELTINE WA. Alkylating agent resistance: in vitro studies with human cell lines. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; **82**: 2151–2162.
- [24] FRY DW, JACKSON RC. Membrane transport alterations as a mechanism of resistance to anticancer agents. *Cancer Surveys* 1986; **5**: 47–79.

- [25] GOLDIE JH, COLDMAN AJ. A mathematic model for relating the drug sensitivity of tumours to their spontaneous mutation rate. *Cancer Treat Rep* 1979; **63**: 1727-1733.
- [26] GOLDIE JH, COLDMAN AJ. Genetic instability in the development of drug resistance. *Sem Oncol* 1985; **12**: 222-230.
- [27] GOODMAN GE, YEN YP, COX TC, CROWLEY J. Effect of verapamil on in vitro cytotoxicity of adriamycin and vinblastine in human tumor cells. *Cancer Res* 1987; **47**: 2295-2304.
- [28] GRAHAM KA, RICHARDSON CI, MINDEN MD, TRENT JM, BUICK RN. Varying degree of amplification of the *N-ras* oncogene in the human breast cancer cell line MCF-7. *Cancer Res* 1985; **45**: 2201-2205.
- [29] GROSS RB, SCANLON KJ. Amino acid membrane transport properties of L1210 cells resistant to cisplatin. *Chemioterapia* 1986; **5**: 37-43.
- [30] HACHN P, KAPP LN, MORGAN WF, PAINTER RB. Chromosomal changes without DNA overproduction in hydroxyurea-treated mammalian cells: implications for gene amplification. *Cancer Res* 1986; **46**: 4607-4612.
- [31] HAMILTON TC, WINKER MA, LOUIE KG, BATIST G, BEHRENS BC, TSURUO T, GROTZINGER KR, McKOY WM, YOUNG RC, OZOLS RF. Augmentation of adriamycin, melphalan and cisplatin cytotoxicity in drug-resistant and -sensitive human ovarian carcinoma cell lines by buthionine sulfoximide mediated glutathione depletion. *Biochem Pharmacol* 1985; **34**: 2583-2586.
- [32] HARPER ME, SAUNDERS GF. Localization of single copy DNA sequences on G-banded human chromosomes by in situ hybridization. *Chromosoma* 1981; **83**: 431-439.
- [33] HAUS O, PAUWELS C, POUPON MF, BERGER R. Chromosome analysis of rat tumor cell lines associated with metastatic potential and drug resistance. Invasion, Metastasis. 1986; **6**: 180-196.
- [34] HOLLEY RW. A unifying hypothesis concerning the nature of malignant growth. *Proc Natl Acad Sci USA* 1972; **69**: 2840-2841.
- [35] HORNS RC, DOWER WJ, SCHIMKE RT. Gene amplification in a leukemia patient treated with methotrexate. *J Clin Oncol* 1984; **2**: 2-7.
- [36] HOWELL SB, MURPHY MP, JOHNSON J, WAMSLEY P, VERMA I. Gene therapy for thioguanine resistant human leukemia. *Mol Biol Med* 1987; **4**: 157-168.
- [37] HROMAS RA, ANDREWS PA, MURPHY MP, BURNS CP. Glutathione depletion reverses cisplatin resistance in murine L1210 leukemia cells. *Cancer Lett* 1987; **34**: 9-13.
- [38] HUGHES CS, SHEN JW, SUBJECK JR. Resistance to etoposide induced by three glucose regulated stresses in Chinese hamster ovary cells. *Cancer Res* 1989; **49**: 4452-4454.
- [39] INABA M, MARUYAMA E. Reversal of resistance to vincristine in P388 leukemia by various polycyclic clinical drugs, with a special emphasis on quinacrine. *Cancer Res* 1988; **48**: 2064-2067.
- [40] INOUE K, MUKAYAMA T, MITSUI I, OGAWA M. In vitro evaluation of anticancer drugs in relation to development of drug resistance in the human tumor clonogenic assay. *Cancer Chemother Pharmacol* 1985; **15**: 208-213.
- [41] KASHANI-SABET M, ROSSI JJ, LU Y, MA JX, CHEN J, MIYACHI H, SCANLON KJ. Detection of drug resistance in human tumors by in vitro enzymatic amplification. *Cancer Res* 1988; **48**: 5775-5778.
- [42] KAYE S, MERRY S. Tumor cell resistance to anthracyclines. A review. *Cancer Chemother Pharmacol* 1985; **14**: 96-103.
- [43] KLOBUTHER RA, RUDDLE FH. Phenotype stabilization and integration of transferred material in chromosome-mediated gene transfer. *Nature* 1979; **280**: 657-660.
- [44] KUCZEK T, CHAN TCK. Mathematical modeling for tumor resistance. *J Natl Canc Inst* 1988; **80**: 146-147.
- [45] LAVAL F. Repair of methylated bases in mammalian cells during adoptive response to alkylating agents. *Biochimie* 1985; **67**: 361-364.
- [46] LAVI S. Carcinogen mediated amplification of viral DNA sequences in simian virus 40-transformed Chinese hamster embryo cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981; **78**: 6144-6148.
- [47] LEE FYF, SIEMANN DW, SUTHERLAND RH. Changes in cellular glutathione content during adriamycin treatment in human ovarian cancer - a possible indicator of chemosensitivity. *Brit J Cancer* 1989; **60**: 291-298.
- [48] MANIATIS T, FRITSCH EF, SAMBROCK J. Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory 1982.
- [49] MARIANI BD, SCHIMKE RT. Gene amplification in a single cell cycle in Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem* 1984; **259**: 1901-1910.
- [50] MELTZER P, KINZLER K, VOGELSTEIN B, TRENT JM. Gene amplification in cancer: A molecular cytogenetic approach. *Cancer Genet Cytogenet* 1986; **19**: 93-99.



- [51] MICETICH K, ZWELLING LA, KOHN KW. Quenching of DNA-platinum (II) monoadducts as a possible mechanism of resistance to cis-diaminedichloroplatinum (II) in L1210 cells. *Cancer Res* 1983; **43**: 3609–3613.
- [52] MICHELSON S, SLATE D. Emergence of the drug resistant phenotype in tumor subpopulations: a hybrid model. *J Natl Cancer Inst* 1989; **81**: 1392–1401.
- [53] MINI E, MOROSON BA, FRANCO CT, BERTINO JR. Cytotoxic effects of folate antagonists against methotrexate-resistant human leukemia lymphoblast CCRF-CEM cell lines. *Cancer Res* 1985; **45**: 325–330.
- [54] MINI E, SRIMATKANDADA S, MEDINA WD, MOROSON BA, CARMAN MD, BERTINO JR. Molecular and karyological analysis of methotrexate-resistant and sensitive human leukemic CCRF-CEM cells. *Cancer Res* 1985; **47**: 317–324.
- [55] MUNGIKARA, CHITNIS M, GEOTHOSKAR B. Mixed function oxidase enzymes in adriamycin-sensitive and resistant sublines of P388 leukemia. *Chem Biol Interact* 1981; **35**: 119–124.
- [56] NOWELL PC. Mechanisms of tumor progression. *Cancer Res* 1986; **44**: 3801–3805.
- [57] ONODA JM, NELSON KK, TAYLOR JD, HONN KV. In vivo characterization of combination antitumor chemotherapy with calcium channel blockers and cis-diaminedichloroplatinum (II). *Cancer Res* 1989; **49**: 2844–2850.
- [58] PASTAN I, GOTTESMAN M. Multiple drug resistance in human cancer. *N Engl J Med* 1987; **316**: 1388–1393.
- [59] PAUWELS-VERGELY C, POUPON MF. Chlorozotocin-induced selection of autocrine and multidrug resistant – variants from a rhabdomyosarcoma. *Anticancer Res* 1988; **8**: 137–144.
- [60] RATH H, TILLY T, SCHIMKE RT. Rapid emergence of methotrexate resistance in cultured mouse cells. *Cancer Res* 1984; **44**: 3303–3306.
- [61] ROBINS P, HARRIS AL, GOLDSMITH I, LINDAHL T. Cross-linking of DNA induced by chloroethylnitrosourea is prevented by O<sup>6</sup>-methylguanine-DNA-methyl-transferase. *Nucleic Acid Res* 1983; **11**: 7743–7758.
- [62] ROCKWELL S, KEYES SR, SARTORELLI AC. Modulation of the antineoplastic efficacy of mitomycin C by dicoumarol in vivo. *Cancer Chemother Pharmacol* 1989; **24**: 349–353.
- [63] RONINSON IB. Detection and mapping of homologous, repeated and amplified DNA sequences by DNA renaturation in agarose gels. *Nucleic Acid Res* 1983; **11**: 5413–5431.
- [64] ROSENBERG B. Fundamental studies with cisplatin. *Cancer* 1985; **55**: 2303–2316.
- [65] ROSENTHAL SA, HAIT WN. Potentiation of DNA damage and cytotoxicity by calmodulin antagonists. *Yale J Biol Med* 1988; **61**: 39–49.
- [66] ROSS DD, JONECKIS CC, SCHIFFER CA. Effects of verapamil on in vitro intracellular accumulation and retention of daunorubicin in blast cells from patients with acute nonlymphocytic leukemia. *Blood* 1986; **68**: 83–88.
- [67] ROSS W, SULLUVAN DM, CHOW KC. Altered function of DNA topoisomerases as a basis for antineoplastic drug action. [w] De Vita VT, Helman S, SA Rosenberg (red.) Important Advances in Oncology. (wyd) JB Lippincott Co, 1988: 65–80.
- [68] ROSSANA C, RAO LG, JOHNSON LF. Thymidylate synthetase overproduction in 5-fluorodioxuridine-resistant mouse fibroblasts. *Mol Cell Biol* 1982; **2**: 1031–1037.
- [69] SARIBAN E, KOHN KW, ZLOTOGORSKI C, LAURENT G, D'INCALCI M, DAY III R, SMITH BH, KORNBLITH PL, ERICKSON LC. DNA crosslinking responses of human malignant glioma cell strains to chloroethylnitrosoureas, cisplatin and diaziquone. *Cancer Res* 1987; **47**: 3988–3994.
- [70] SCANLON KJ, KASHANI-SABET M. Elevated expression of thymidylate synthase cycle genes in cisplatin-resistant human ovarian carcinoma A 2/80 cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; **85**: 650–653.
- [71] SCANLON KJ, KASHANI-SABET M, CASHMORE AR, PALLAI M, MOROSON BA, SAKETOS M. The role of methionine in methotrexate-sensitive and methotrexate-resistant mouse leukemia L1210 cells. *Cancer Chemother Pharmacol* 1987; **19**: 25–29.
- [72] SCANLON KJ, KASHANI-SABET M. Utility of the polymerase chain reaction in detection of gene expression in drug resistant human tumors. *J Clin Laborat Anal* 1989; **3**: 323–329.
- [73] SCHIMKE RT. Gene amplification, drug resistance and cancer. *Cancer Res* 1984; **44**: 1735–1742.
- [74] SCHIMKE RT. Gene amplification in cultured cells. *J Biol Chem* 1988; **263**: 4989–4992.
- [75] SCHIMKERT, HILL A, JOHNSON RN. Methotrexate resistance and gene amplification: An experimental model for the generation of cellular heterogeneity. *Brit J Cancer* 1985; **51**: 459–465.
- [76] SCHMID FA, OTTER GM, HIRANO I. L1210 leukemia hybrids isolated after fusion of alkylating agent-resistant sublines. *Leukemia Res* 1988; **12**: 67–70.
- [77] SHARMA RC, SCHIMKE RT. Enhancement of the frequency of methotrexate resistance by  $\gamma$ -radiation in Chinese hamster ovary and mouse 3T3 cells. *Cancer Res* 1989; **49**: 3861–3866.

- [78] SHINOYA S, LU Y, SCANLON KJ. Properties of amino acid transport systems in K562 cells sensitive and resistant to cis-diamminedichloroplatinum (II). *Cancer Res* 1986; **46**: 3445–3448.
- [79] SIMONSEN CC, LEVINSON AD. Isolation and expression of an altered mouse dihydrofolate reductase cDNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983; **80**: 2495–2499.
- [80] SINHA BK, DUSRE L, COLLINS C, MYERS CE. Resistance of paraquat and adriamycin in human breast tumor cells: role of free radical formation. *Biochim Biophys Acta* 1989; **1010**: 304–310.
- [81] SIROTNAK FM, MOCCIO DM, KELLEHER LE, GOUTAS LJ. Relative frequency and kinetic properties of transport defective phenotypes among methotrexate-resistant L1210 clonal cells derived in vivo. *Cancer Res* 1981; **41**: 4447–4452.
- [82] SLOVAK ML, MELTZNER PS, DALTON WS, BECK W, SOLE S, TRENT JM. Cytogenetic and molecular genetic alterations associated with the development of anthracycline resistance. II International Conference on Chromosomes in Solid Tumors, Tucson USA 1987.
- [83] SONO A, SAKAGUCHI K. Isolation and characterisation of Chinese hamster cell line resistant to monofunctional alkylating agents. *Somat Cell Mol Genet* 1988; **14**: 329–344.
- [84] SOUTHERN EM. Specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* 1975; **98**: 503–517.
- [85] SPRADLING AC. The organization and amplification of two chromosomal domains containing *Drosophila* chorion genes. *Cell* 1981; **27**: 193–201.
- [86] SPRIMATKANDADA S, MEDINA WD, CASHMORE AR, WHYTE W, ENGEL D, MOROSON BA, FRANCO CT, DUBE SK, BERTINO JR. Amplification and organization of dihydrofolate reductase genes in a human leukemic cell line, K-562, resistant to methotrexate. *Biochemistry* 1983; **22**: 5774–5781.
- [87] STARK GR, WAHL GM. Gene amplification. *Ann Rev Biochem* 1984; **53**: 447–491.
- [88] TEICHER BA, CUCCHI CA, LEE JB, FLATOW JL, ROISOVSKY A, FREI E. Alkylating agents: in vitro studies of cross-resistance patterns in human cell lines. *Cancer Res* 1986; **46**: 4379–4386.
- [89] TRENT JM, BUICK RN, OLSON S, HORNS RC, SCHIMKE RT. Cytologic evidence for gene amplification in methotrexate-resistant cells obtained from a patient with ovarian adenocarcinoma. *J Clin Oncol* 1984; **2**: 8–15.
- [90] WAHL GM, CAROLL S, GAUDRAY R, RUIZ J, von HOFF D. Gene transfer models of gene amplification. II International Conference on Chromosomes in Solid Tumors. Tucson USA 1987: abstr. 7.
- [91] WOLF CR, LEWIS AD, CARMICHAEL J, ROBSON CN, HICKSON I, HARRIS AH, HAYES JD. The role of glutathione S-transferases in the resistance of cells to cytostatic drugs. IV European Conference on Clinical Oncology and Cancer Nursing, Madrid. 1987, abstracts, str. 325.
- [92] WOLMAN SR, CRAVEN ML, GRILL SP, DOMIN BA, CHENG YC. Quantitative correlation of homogeneously stained regions on chromosome 10 with dihydrofolate reductase enzyme in human cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983; **80**: 807–809.
- [93] YENG CY, INGOLIA DE, BOBONIS C, DUNBAR BS, RISER ME, SICILIANO MJ, KELLEMS RE. Selective overproduction of adenosine deaminase in cultured mouse cells. *J Biol Chem* 1983; **258**: 8338–8345.
- [94] ZIJLSTRA JG. Mechanisms and circumvention of drug resistance in tumor cells. *Pharmaceutisch Weekblad Scientific Editions* 1987; **9**: 283–284.
- [95] ZIMM S, REAMAN G, MURPHY RF, POPLACK DG. Biochemical parameters of mercaptopurine activity in patients with acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Res* 1986; **46**: 1495–1498.

Otrzymano: lipiec 1989,

Przyjęto: marzec 1990.

Adres autorki ul. K. Marcinkowskiego 1, 50-368 Wrocław

## GENETYCZNE ASPEKTY OPORNOŚCI KOMÓREK NOWOTWOROWYCH NA CYTOSTATYKI II. OPORNOŚĆ WIELOLEKOWA

### CANCER CELL RESISTANCE TO CYTOSTATIC DRUGS. GENETIC ASPECTS. II. MULTIDRUG RESISTANCE

Olga HAUS

Katedra i Zakład Patofizjologii Akademii Medycznej we Wrocławiu

*Streszczenie.* Oporność wielolekowa (*MDR*) jest równoczesną opornością komórek nowotworowych na antracykliny, akrydyny, podofilotoksyny, alkaloidy *Vinca rosea*, kolchicynę i aktynomycynę D. Głównym mechanizmem *MDR* jest aktywne usuwanie leków z komórki przy pomocy błonowego białka transportowego -P-glikoproteiny, kodowanej przez gen *mdr 1*. Podwyższoną ekspresję *mdr 1*, a w części przypadków również jego amplifikację stwierdza się w wielu komórkach opornych na leki z grupy *MDR*. Blokery kanałów wapniowych (np. werapamil), inhibitory kalmoduliny i wiele innych substancji znoszą ten typ oporności wielolekowej poprzez kompetencyjne łącznie się z -P-glikoproteina i blokowanie usuwania cytostatyków.

*Summary.* Multidrug resistance (*MDR*) is a simultaneous resistance of cancer cells to anthracyclines, acridines, podophyllotoxins, *Vinca* alkaloids, colchicine and actinomycin D. The principal mechanism of *MDR* is an active efflux of cytostatic drugs from the cells assured by a membrane transport protein -P-glycoprotein coded by a gene *mdr 1*. The overexpression of *mdr 1* and in some cases also its amplification in many *MDR* cells was found. Calcium channel blockers (e.g. Verapamil), calmodulin inhibitors and other drugs overcome this type of *MDR* by a competitive binding to -P-glycoprotein and blocking the extrusion of cytostatics.

## ISTOTA OPORNOŚCI WIELOLEKOWEJ

Poważnym problemem klinicznym ograniczającym znacznie możliwości lecznicze w onkologii jest powstawanie oporności krzyżowej na różne cytostatyki, przy czym najbardziej niekorzystnym z klinicznego punktu widzenia jest tzw. oporność wielolekowa (*multidrug resistance* = *MDR*). Oporność wielolekowa jest równoczesną opornością komórek nowotworowych na antracykliny, akrydyny, podofilotoksyny, alkaloidy *Vinca rosea*, kolchicynę i aktynomycynę D [17, 91, 102]. Sporadycznie obserwowana jest również oporność krzyżowa komórek *MDR* na leki alkilujące [35, 38] i uboczna wrażliwość na

substancje aktywne błonowo [35]. Komórki *MDR* nie są natomiast odporne na metotreksat, arabinozyd cytozyny czy deksametazon [1, 90]. Leki należące i nienależące do grupy *MDR* przedstawiono w tabeli 1.

TABELA 1. Leki, na które komórki *MDR* są odporne lub wrażliwe [38, 90, 91, 102]

Oporne	Wrażliwe
Alkaloidy <i>Vinca rosea</i> :	metotreksat ( <i>MTX</i> )
winkrystyna ( <i>VCR</i> )	tioguanina ( <i>TG</i> )
winblastyna ( <i>VBL</i> )	cytarabin a ( <i>ARA-C</i> )
Podofilotoksyny:	
tenipozyd ( <i>VM-26</i> )	cyklofosamid
etopozyd ( <i>VP-16</i> )	nitrozomoczniki:
Aktynomycyna D	karmustyna ( <i>BCNU</i> )
	lomustyna ( <i>CCNU</i> )
Antracykliny:	
doksorubicyna	bleomycyna
daunorubicyna	deksametazon
Mitramycyna	
Kolchicyna	
Okazyjnie: leki alkilujące:	
chlormetyna	
mitomycyna C	

Zjawisko oporności wielolekowej przeanalizowali w warunkach laboratoryjnych po raz pierwszy Biedler i Riehm w 1970 r. Inkubując komórki nowotworowe myszy i chomika syryjskiego w środowisku o wzrastającym stężeniu aktynomycyny D spowodowali powstanie oporności nie tylko na ten lek, ale również na wiele innych, m.in. na winblastynę i daunorubicynę [15].

*MDR* powstaje z reguły wskutek selekcji w środowisku zawierającym tylko jeden z leków grupy *MDR* i jest najsilniej wyrażona w stosunku do leku indukującego [91]. W niektórych przypadkach jednak fenotyp oporności wielolekowej uzyskano poprzez indukcję lekiem spoza tej grupy [92].

Obecność cytostatyku w środowisku otaczającym komórkę nie zawsze jest jednak niezbędna do wytworzenia *MDR*. Obserwowane są spontaniczne mutacje o niskiej częstości ( $2 \times 10^{-8}$  komórek) dające fenotyp *MDR* [104]. Ponadto komórki nowotworowe wywodzące się z niektórych narządów, takich jak: nerki, nadnercza, jelito grube, wątroba, a także prawidłowe komórki tych narządów cechują się występującą już a priori opornością wielolekową [50].

Leki, przeciwko którym wytwarzana jest *MDR*, są substancjami o różnych mechanizmach działania, różnej budowie i właściwościach chemicznych. Jediną ich wspólną cechą jest wielkość cząsteczki oraz jej hydrofobowy charakter [91, 102]. Mechanizm *MDR* nie może więc być związany tak, jak w oporności na pojedyncze cytostatyki, ze zmienionym działaniem enzymów docelowych, różnych dla leków w obrębie grupy *MDR*. Nie powiodły się również próby udowodnienia możliwości powstawania *MDR* in vivo poprzez spontaniczną fuzję komórek nowotworowych opornych na pojedyncze cytostatyki, aczkolwiek w badaniach in vitro hybrydy komórkowe wykazywały większe spektrum oporności niż obie "komórki rodzicielskie" razem [110].

Mechanizm *MDR* musi być zatem wspólny dla wszystkich leków, związany ze wspólnym punktem uchwytu. Jednym z takich "punktów wspólnych", w którym jednakowe właściwości fizykochemiczne mogą odgrywać rolę, jest transport przez błonę komórkową.

### ZABURZENIE TRANSPORTU LEKÓW PRZEZ BŁONĘ KOMÓRKOWĄ JAKO MECHANIZM *MDR*

Ling i wsp. pierwsi wykazali związek *MDR* ze zmniejszoną akumulacją leków w komórce [6, 74]. Późniejsze badania potwierdziły pogląd, że stopień oporności jest odwrotnie proporcjonalny do stopnia gromadzenia leku w komórce [41, 45, 128, 69]. Zmniejszenie gromadzenia leku próbowano wiązać początkowo jedynie ze zmniejszonym jego transportem do wnętrza komórki [73] lub ze zmienionym wewnątrzkomórkowym wiązaniem leku [10], ale w szeregu badań nad wewnątrzkomórkową farmakokinetyką leków *MDR* wykazano, że przyczyną jest tu głównie zwiększenie wydalania leku [20, 55, 70, 129]. Transport ten jest aktywny, niezależny od stężenia leku po obu stronach błony komórkowej [41, 128], wymaga więc nakładu energii. Udowodniono, że wydalanie leków z komórki może ulec zahamowaniu wskutek działania inhibitorów procesów uwalniania jak np. 2-deoksyglukozy [7, 128]. Wprowadzenie tych substancji do środowiska spowodowało stopień akumulacji leku w komórkach opornych do wartości spotkanych w odpowiednich komórkach wrażliwych.

Zmieniony transport błonowy komórek opornych spowodowany jest zmienionymi właściwościami ich plazmolemy w stosunku do komórek wrażliwych. Najbardziej charakterystyczną, najczęściej powtarzającą się cechą błony komórkowej komórek *MDR* jest zwiększona ekspresja glikoproteiny o masie cząsteczkowej 170 kDa, nazwanej P-glikoproteiną (*permeability glycoprotein = P-gp*) [29, 64, 68, 74]. Ekspresja *P-gp* skojarzona jest z podwyższonym poziomem *m-RNA* dla tego białka – transkryptu o wielkości 4,5 kb [111].

### P-GLIKOPROTEINA

Stosując przeciwciała monoklonalne przeciw P-glikoproteinie [55, 67, 129] i technikę immunofluorescencji lub *Western blot* wykazano, że poziom *P-gp* koreluje ze stopniem *MDR* w wielu zwierzęcych [125] i ludzkich [20, 36, 65, 69] liniach komórkowych i jest odwrotnie proporcjonalny do stopnia akumulacji leków w komórce [68, 74]. Wzrost ekspresji *P-gp* został również stwierdzony w badaniach klinicznych, np. w komórkach raka jajnika [13], białaczek [4, 67, 76, 126] i szpiczaka [39] pobranych od pacjentów opornych na chemioterapię. Wysoki poziom *P-gp* stwierdzono również w nieleczonym uprzednio raku jajnika [126, 127] i płuc [13]. Ze względu na dobro tych pacjentów leczenie prowadzono od początku lekami spoza grupy *MDR*, a więc niemożliwa była ocena zgodności klinicznej ze stopniem laboratoryjnie stwierdzonej oporności na leki.

Niewielka ilość cząsteczek *P-gp* obecna jest w błonach komórkowych wszystkich dotąd przebadanych prawidłowych tkanek i narządów [111]. Natomiast wysoką ekspresję *P-gp* bez uprzedniego kontaktu z cytostatykami stwierdzono tylko w niektórych zdrowych narządach i nowotworach wywodzących się z nich (tab. 2). W badaniach laboratoryjnych wykazano, że komórki tych tkanek cechują się pierwotną opornością wielolekową (tzw. naturalną albo wewnętrzną opornością) [38, 42]. Początkowo sugerowano, że *P-gp* działa jedynie pośrednio jako pompa wypłukująca leki z komórki albo element zwiększający przepuszczalność (*permeability*) plazmolemy [96]. Nowsze badania, przeprowadzone z

użyciem znakowanych analogów winblastyny ( $^3\text{H-VBL}$ ) i wyciągów z błon komórkowych wykazały, że cząsteczki leków mogą wiązać się bezpośrednio z *P-gp* zarówno w komórkach opornych, jak i wrażliwych, przy czym stopień wiązania jest większy w komórkach *MDR* [63, 64, 67]. Przyłączanie leków do cząsteczki *P-gp* odbywa się z reguły na zasadzie konkurencji o miejsce wiązania. Biorą w niej udział nie tylko cytostatyki z grupy *MDR*, ale również inne leki – blokery kanałów wapniowych, np. Verapamil [28], chinidyna [29].

TABELA 2. Wysoka pierwotna ekspresja *mdr 1* (wysoki poziom P-glikoproteiny i 4,5 kb mRNA) w prawidłowych tkankach (wg malejącej ekspresji) i w nieleczonych nowotworach [35, 37, 90]

Prawidłowa tkanka	Nowotwór
Nadnercza	guz chromochłonny nadnerczy
Nerki	rak nerki
Wątroba	rak wątroby
Okrężnica	rak okrężnicy
Płuca	
Trzustka	
Jelito cienkie	
Łożysko	
Endometrium w czasie ciąży	gruczolakorak macicy

#### RODZINA BIAŁEK *P-gp*

W procesie ewolucji P-glikoproteina jest białkiem przekazywanym w wysoce konserwatywny sposób, wykazującym homologię w zakresie wielkości i budowy cząsteczki oraz immunologicznej reaktywności w obrębie wszystkich gatunków – od bakterii do człowieka [38]. U wyższych eukariontów P-glikoproteina tworzy niewielką rodzinę wysoce homologicznych białek [38]. Ich masa cząsteczkowa wyznaczona na podstawie ruchliwości elektroforetycznej waha się od 130 do 230 kDa [47].

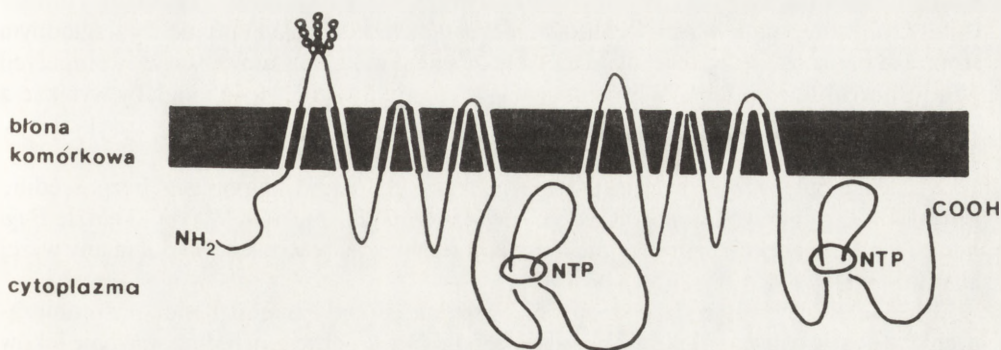
Zwiększoną ekspresję całej tej grupy białek stwierdzono w komórkach opornych, przy czym ilościowe proporcje poszczególnych białek zmieniają się od komórki do komórki [47]. Najlepiej poznane jest wyżej wspomniane białko o m. cz. 170 kDa, nieco mniej *P-gp* o m. cz. 180 kDa, mająca podobne podstawowe właściwości [82]. Prawdopodobnie cała rodzina *P-gp* odgrywa zamiennie rolę w oporności [82]. Równoległe powstawanie białek o różnej m. cz., aczkolwiek o bardzo podobnej strukturze może być tłumaczone przez kodowanie ich przez niewielką rodzinę homologicznych genów [47, 101] oraz rekombinację genów lub przez modyfikacje potranskrypcyjne [82]. Z drugiej strony tak duża heterogenność może wynikać z alternatywnych potranslacyjnych modyfikacji małej grupy białek lub podstawowego peptydu [82].

#### STRUKTURA I MECHANIZM DZIAŁANIA CZĄSTECZKI P-GLIKOPROTEINY

Podstawowa cząsteczka *P-gp*, której strukturę wydedukowano z analizy pełnej sekwencji c-DNA P-glikoprotein wyizolowanych z ludzkich [24] i zwierzęcych [46, 48] komórek opornych, ma masę ok. 140 kDa i składa się z ok. 1280 aminokwasów. Dane te uzyskano także przez analizę struktury nie glikozylowanej postaci *P-gp* [35].

Cząsteczka *P-gp* zbudowana jest z dwóch prawie identycznych podjednostek tworzących "kanał" w błonie komórkowej. W każdej połowie wyróżnić można region hydrofobowy kończący się atomem azotu (N-koniec) i region hydrofilny zakończony grupą karboksylową [35]. Każdy z regionów hydrofobowych tworzy 6 transmembranowych struktur złożonych

z 2 podjednostek. W obrębie regionów hydrofilnych zlokalizowanych po stronie wewnętrznej błony komórkowej znajdują się "fałdy" wiążące nukleotydy (ATP lub GTP). Ponadto na najbardziej zewnętrznej N-końcowej pętli znajdują się potencjalne miejsca glikozylacji (rys. 1) [30].



RYS. 1. Schemat budowy cząsteczki P-glikoproteiny \* – potencjalne miejsca glikozylacji, NTP – nukleozydotrifosforan (wg [78])

Sekwencje homologiczne do pętli wiążących nukleotydy znaleziono również w wielu białkach biorących udział w systemach transportowych bakterii. Inne elementy budowy cząsteczki *P-gp* są również, choć nie w tym samym stopniu, podobne do struktury białek bakteryjnych [2, 48]. Największe jest podobieństwo do białka transportowego bakterii hemolitycznych *Hly-B* [46]. Z powyższych danych wynika, że *P-gp* jest prawdopodobnie członkiem homologicznej grupy aktywnie transportujących białek związanych z błoną komórkową.

#### NIEKTÓRE WŁAŚCIWOŚCI BIOCHEMICZNE

*P-gp* może być glikozylowana, fosforylowana [54], może wiązać ATP [30]. Glikozylacja N-końca nie jest jednak niezbędna do *MDR* [73]. Zmiany w zakresie stopnia fosforylacji reszt serynowych i treoninowych mogą natomiast modyfikować funkcję *P-gp*, ale nie zostało to jeszcze w pełni udokumentowane [38].

Aktywne wiązanie się z cząsteczkami leku oraz aktywne wydalanie leku wymaga nakładu energii, którą cząsteczka *P-gp* czerpie z bezpośredniego wiązania się z ATP lub innymi trójfosforanami nukleozydów. Udowodniono, że wydalanie  $^3\text{H-VBL}$  z pęcherzyków błonowych komórek *MDR* wymaga obecności ATP [61]. Prawdopodobnie również stopień wiązania leku oraz ilość związanych cząsteczek zależy od energii z ATP. W badaniach z zastosowaniem nierozpuszczalnych homologów ATP lub układów bez ATP stwierdzono gwałtowny spadek wiązania *VCR* do *P-gp* [86].

#### MECHANIZM DZIAŁANIA *P-gp*

Na podstawie dotychczas poznanych właściwości biochemicznych *P-gp* oraz jej podobieństwa z białkami transportowymi bakterii rozpatrywać można dwa alternatywne modele działania *P-gp*:

1. Analogicznie do modelu *Hly-B* [2, 48] zakłada się istnienie białek pośredniczących, tj. nośników białkowych o szerokim spektrum rozpoznawania leków. W układzie tym leki należące do różnych grup wiązałyby się z różnymi białkami nośnikowymi i jako kompleksy lek-nośnik rywalizowały o ten sam niespecyficzny system transportowy *P-gp* [46]. Zjawisko oporności krzyżowej odzwierciedlałby tu fakt, że ilość białka transportującego (*P-gp*) byłaby limitowana dla całego procesu transportu [35, 45]. Taki mechanizm mógłby również tłumaczyć występujący w pewnych doświadczeniach brak korelacji pomiędzy względnym stopniem oporności krzyżowej dla danego leku a jego względną zdolnością do kompetycji w transporcie innego leku. W przedstawionym modelu rozbieżność mogłaby wynikać z faktu, że ilości poszczególnych specyficznych białek nośnikowych mogą być różne [45] (rys. 2a).

2. Leki mogłyby być transportowane na zewnątrz komórki poprzez bezpośrednie wiązanie z *P-gp* udowodnione w szeregu doświadczeń [22, 29, 107]. W tym układzie *P-gp* musiałaby mieć więcej niż jedno miejsce wiązania leku, żeby wyjaśnić wspomniany wyżej brak korelacji [28, 29] (rys. 2b).

Obie te hipotezy mają słabe strony: nie wykazano dotąd istnienia białek pośredniczących w procesie usuwania leków z komórki (model 1), z kolei bezpośrednie wiązanie leków z *P-gp* (model 2) w przeprowadzanych doświadczeniach nie było skojarzone z ich aktywnym usuwaniem [28, 29, 107]. Ponadto brak jest jeszcze bezpośredniego dowodu, że białko *P-gp* jest białkiem transportującym. Przeprowadzenie takiego dowodu wymagałoby wbudowania *P-gp* do pęcherzyków błonowych w układzie doświadczalnym i wykazania, że nowo-budowane cząsteczki transportują lek [91].

## RODZINA GENÓW P-GLIKOPROTEINY

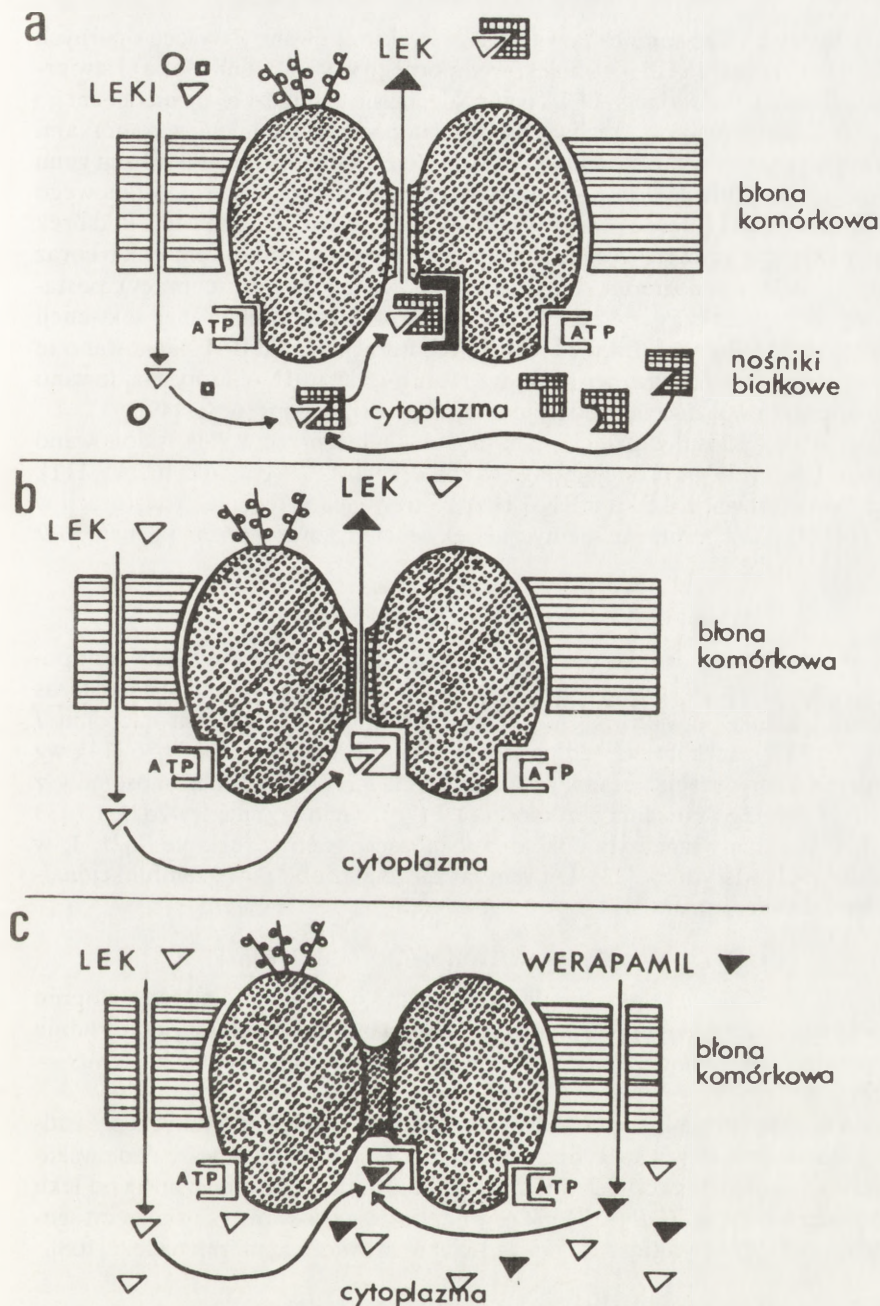
Porównanie sekwencji c-DNA P-glikoprotein i DNA klonowanego za pomocą zamplifikowanych sekwencji obecnych w genomie komórek opornych wykazało, że *P-gp* kodowane jest przez rodzinę trzech genów, z których każdy może kodować kompletną cząsteczkę *P-gp* [37, 52, 101, 115, 124]. Ogólna struktura każdej z 3 form jest jednakowa, aczkolwiek istnieją między nimi drobne różnice, które być może odzwierciedlają różnice w funkcji tych genów.

Człowiek i prawdopodobnie inne naczelne mają dwie izoformy genu *P-gp*: *mdr 1* i *mdr 3* [37], wg innych źródeł *mdr 1* i *mdr 2* [101]; gryznie mają trzy. Analiza 3' końca każdej z izoform wykazała, że aczkolwiek region ten różni się pomiędzy izoformami genów w obrębie gatunku, jest on jednak zachowany w konserwatywny sposób w homologicznych izoformach w gatunkach różnych [35, 101]. Każdy z genów *mdr 1*, 2 i 3 może występować w kilku wariantach różniących się m.in. miejscami rozpoczynania transkrypcji [122] lub różnymi miejscami poliadenylacji [37]. Użycie każdego wariantu pozwala komórce na regulację ekspresji każdej z form *P-gp* i może wpływać na ekspresję *MDR*. W przeprowadzonych dotychczas badaniach nad transfekcją genów *mdr* wykazano, że u człowieka jedynie klasa *mdr 1* wpływa na powstawanie fenotypu *MDR*, czego dotychczas nie udało się wykazać dla *mdr 2* i 3 [50, 112].

### GEN *mdr 1*

Najlepiej poznanym genem z rodziny *mdr* jest *mdr 1* kodujący *P-gp* o m. cz. 170 kDa. W identyfikacji tego genu zastosowano dwa podejścia:





RYS. 2. Mechanizm działania cząsteczki P-glikoproteiny: a – model 1 uwzględniający istnienie nośników białkowych: ○□ – cząsteczki różnych leków cytostatycznych, ] – receptor P-glikoproteinowy dla nośników białkowych, b – model 2, uwzględniający bezpośrednie wiązania leków do P-glikoproteiny: ▽ – cząsteczki leków cytostatycznych, ] – receptor P-glikoproteinowy dla cząsteczek leków, c – zapobieganie wydalaniu leków z komórki przez werapamil i inne podobnie działające substancje ▽ – lek cytostatyczny, ▽ – werapamil, ] – receptor P-glikoproteinowy wspólny dla cytostatyków, blokerów kanałów wapniowych, inhibitorów kalmoduliny itd. (wg [91] zmodyfikowane)

- Z jednej strony analizowano całkowite DNA wyekstrahowane z wysoce opornych komórek *MDR* (linia komórek KB – wielolekowo opornego wariantu linii HeLa) i stwierdzono w nim obecność jednorodnego DNA o wysokiej masie cząsteczkowej, nieobecnego w odpowiednich liniach komórek wrażliwych [112]. Na podstawie analogii z komórkami opornymi na pojedyncze cytostatyki, w których najczęściej dochodzi do amplifikacji genu odpowiedzialnego za oporność i na podstawie obserwacji materiału chromosomowego typu *double minutes (DMs)* (część I pracy) oraz zauważenia faktu, że hodowanie komórek w środowisku o zwiększającym się stężeniu leku powoduje powstawanie komórek o coraz większym stopniu *MDR* (analogicznie do zjawiska opisywanego w I części pracy), postawiono hipotezę, że wysokocząsteczkowy DNA odpowiada zamplifikowanej sekwencji odpowiedzialnej za *MDR* [90]. Stosując technikę renaturacji w żelu [99] sklonowano te zamplifikowane sekwencje. Jedna z nich hybrydyzowała z 4,5 kb mRNA, który znajdowano w komórkach opornych w ilościach proporcjonalnych do stopnia oporności [49].

- Z drugiej strony stosując przeciwciała monoklonalne przeciw *P-gp* sklonowano komplementarny DNA (cDNA) kodujący *P-gp* w komórkach *MDR* chomika [67, 95, 111], który również hybrydyzował z 4,5 kb mRNA oraz z otrzymaną w technice renaturacji w żelu sekwencją [123]. Obie te prawie identyczne sekwencje nazwano później genem *mdr 1*.

#### CHROMOSOMOWA LOKALIZACJA *mdr 1*.

Do zlokalizowania genu *mdr 1* zastosowano sondy genowe zbudowane z cDNA odpowiadającego niezmienniej części cząsteczki *P-gp* chomika i człowieka. Wszystkie dotychczas przeprowadzone badania potwierdzają lokalizację na ramieniu długim chromosomu 7 człowieka [14, 23, 119], aczkolwiek według jednych danych jest to region 7q36 [14], wg innych, w których hybrydyzację *in situ* prowadzono na preparatach chromosomów z częściową delecją długiego ramienia chromosomu 7 (7q), region pomiędzy 7q21 a 7q33 [119]. Późniejsze badania wyznaczyły dokładną lokalizację genu w regionie 7q21, 1, w pobliżu genu dla mukowiscydozy [23]. Dotychczas nie znaleziono powiązań funkcjonalnych między tymi dwoma genami.

#### ZMIANY CHROMOSOMOWE W KOMÓRKACH *MDR*

Zmiany te odpowiadają z reguły amplifikacji genów *mdr*. Przy znacznym stopniu amplifikacji w komórkach występują chromosomy z regionami barwiącymi się jednorodnie (*HSR = homogeneously staining regions*) albo tzw. podwójne małe chromosomy (*DMs = double minutes*, patrz cz. I).

Poza zmianami związanymi z amplifikacją genów *mdr* nie znaleziono dotychczas żadnych aberracji chromosomowych specyficznych dla *MDR*, chociaż najnowsze dane wskazują na powstawanie różnych swoistych anomalii chromosomowych w zależności od leku użytego do indukcji fenotypu *MDR* [117], jak również na związek swoistych zmian cytogenetycznych ze zjawiskiem odwrotnym do oporności – wrażliwości komórek na leki [108].

#### EKSPRESJA GENU *mdr 1* W KOMÓRKACH *MDR*

Wzrost ekspresji genu *mdr 1* stwierdzono w wielu ludzkich [16, 101, 102, 121] i zwierzęcych [33, 49, 95, 111, 114] liniach komórek *MDR* jak również u pacjentów opornych na chemioterapię [18, 59]. Stopień ekspresji korelował z reguły z zawartością *P-gp* w badanych komórkach jak i ze stopniem oporności na leki z grupy *MDR*. Stwierdzono, że przy

oporności niższego stopnia występuje jedynie zwiększenie ekspresji genu *mdr 1* (bez jego amplifikacji) w postaci wzrostu ilości jego transkryptu (4,5 kb mRNA) lub produktu (170 kDa *P-gp*) [16, 22, 102]. Natomiast wyższe stopnie oporności związane są z amplifikacją *mdr 1*, przy czym jej stopień (liczba kopii genu) koreluje ze stopniem *MDR* [20, 90]. Przy hodowli komórek w środowisku o wzrastającym stężeniu cytostatyku z grupy *MDR* – obserwowano najpierw pojawienie się *DMs*, a później w liniach, które były trwale odporne na wysokie stężenia leku, zastępowanie *DMs* przez *HSR* [33].

#### PRZENOSZENIE OPORNOŚCI

Bezpośrednim dowodem przemawiającym za przyczynową rolę *mdr 1* w powstawaniu oporności wielolekowej jest przeniesienie fenotypu *MDR* z komórek opornych na komórki wrażliwe poprzez transfekcję tych ostatnich sekwencjami DNA zawierającymi gen *mdr 1* [50, 51, 102, 121]. W każdym z takich doświadczeń pojawiły się w komórkach biorcy objawy ekspresji *mdr 1* w postaci podwyższonego poziomu *mdr 1* mRNA, 170 kDa *P-gp* oraz pełna lub częściowa ekspresja fenotypu *MDR* (wzrost wydalania leków z komórki, obniżenia kumulacji leków itd.) [57].

#### EKSPRESJA GENU *mdr 1* W PRAWIDŁOWYCH TKANKACH I NIELECZONYCH NOWOTWORACH

Zwiększoną ekspresję *mdr 1* wyrażającą się m.in. omówionym wzrostem poziomu *P-gp* stwierdzono w wielu prawidłowych tkankach i narządach pełniących funkcje detoksykacyjne [59, 90, 91] oraz w nieleczonych uprzednio nowotworach wywodzących się z tych tkanek [42, 59, 66, 91] (tab. 2), z reguły pierwotnie opornych na leki z grupy *MDR*. Zauważono, że nowotwory te zachowują wysoki poziom 4,5 kb mRNA, charakterystyczny dla macierzystych tkanek. Dane te sugerują, że naturalna (wewnętrzna, pierwotna) oporność na leki przynajmniej w części zależy od przetrwałej ekspresji genu, którego funkcja w prawidłowych tkankach polega na usuwaniu z komórek substancji toksycznych [91].

#### EKSPRESJA *mdr 1* W STANACH FIZJOLOGICZNYCH I PRZEDNOWOTWOROWYCH

Gwałtowne zwiększenie ekspresji *mdr 1* (*mdr 1* mRNA) zaobserwowano u myszy w obrębie komórek wydzielających nabłonka macicy w czasie ciąży [3] oraz w regenerujących po częściowym wycięciu narządu komórkach wątroby szczura [118]. W pierwszym przypadku ekspresja *mdr 1* uzależniona była od wydzielania estrogenów i progesteronu. Wiadomo, że gruczolakorak endometrium jest oporny na leczenie, co może wynikać z hormonalnie regulowanego już a priori wysokiego poziomu ekspresji *mdr 1* [3]. W drugim przypadku wzrost poziomu *mdr 1* RNA był jedynie przejściowy i powrócił do normy po ok. 120 godz. [11]. Jednakże bardzo wysoki, utrzymujący się trwale poziom *mdr 1* zaobserwowano w przednowotworowych guzkach wątroby szczura po podaniu karcinogenu (inicjacja procesu nowotworowego) i następowej częściowej hepatektomii [118].

#### PRAWIDŁOWA FUNKCJA GENU *mdr 1*

Na podstawie zwiększonej ekspresji *mdr 1* w tkankach cechujących się głównie funkcjami wydzielniczymi i odtruwającymi wnioskować można o ogólnej roli białkowego produktu *mdr 1 P-gp* w transporcie cząsteczek w organizmie, a nie tylko w transporcie leków.

Niskiego stopnia ekspresję *mdr 1* stwierdzono we wszystkich dotychczas przebadanych tkankach i narządach [100]. Fakt ten łącznie z bardzo szerokim spektrum substancji, które mogą być transportowane przez system *mdr*, sugeruje, że mógłby on pełnić w komórce analogiczną funkcję, jaką ma układ immunologiczny wobec całego organizmu, a ekspresja genów *mdr* jest częścią programowej odpowiedzi komórki na uszkodzenie toksyczne [31, 91, 100, 118].

#### *mdr 1* A CHEMICZNA KARCINOGENEZA

Jak wyżej wspomniano, w przednowotworowych zmianach powstałych po zadziałaniu karcinogenu występowała wysoka ekspresja *mdr 1* [118]. Ponadto fenotyp *MDR* w niektórych liniach komórkowych skojarzony jest ze zmianami biochemicznymi podobnymi do zmian w normalnych komórkach powstających podczas ekspozycji na karcinogeny chemiczne [31]. To podobieństwo potwierdza hipotezę, że system *mdr* może obejmować skoordynowane mechanizmy obrony komórkowej, a ponadto pozwala przypuszczać, że naturalna pierwotna oporność wyindukowanych przez karcinogen nowotworów może być właśnie związana z przewlekłą ekspozycją na karcinogen [84].

#### ROZBIEŻNOŚCI MIĘDZY *MDR* A EKSPRESJĄ *mdr 1*

W powyższych rozważaniach przedstawiono jedynie jeden z możliwych mechanizmów oporności wielolekowej uważany w chwili obecnej za najbardziej prawdopodobny. Istnieje jednak wiele dowodów wskazujących, że wzrost ekspresji *mdr 1* nie zawsze jest skorelowany z opornością wielolekową, jak również wiele argumentów przemawia za udziałem w powstawaniu *MDR* zupełnie innych mechanizmów. W szeregu badań laboratoryjnych nie wykazano zależności lub jedynie częściową zależność pomiędzy stopniem oporności wielolekowej mierzonym przeżywalnością komórek, zmniejszoną kumulacją leku lub zwiększonym ich usuwaniem a stopniem ekspresji *mdr 1* [20, 36, 98]. W innych nie wykazano związku między *MDR* a stopniem akumulacji leku [9, 34, 114] czy czynnym jego usuwaniem [113] lub też związek ten był obecny w powiązaniu ze zmienionym rozmieszczeniem leku pomiędzy jądrem a cytoplazmą [69] lub ze zmniejszonym wiązaniem leku do organelli komórkowych [10, 11].

Niektóre linie komórkowe z tzw. atypową opornością wielolekową reprezentowały całe spektrum oporności charakterystycznej dla *MDR* z wyjątkiem oporności na alkaloidy *Vinca rosea* nie wykazując zmian ani w akumulacji leków, ani w ekspresji *mdr 1*. W komórkach tych linii stwierdzono natomiast zmienioną aktywność topoizomerazy II [130, 131]. Inne linie wykazywały różne spektrum oporności w zależności od leku użytego do indukcji *MDR* [12]. Również w niektórych badaniach klinicznych na dużych seriach przypadków nie wykazano korelacji [80, 85] lub jedynie słabą [79] między opornością komórek nowotworowych na leki a ekspresją genu *mdr 1*.

W części powyżej przedstawionych badań laboratoryjnych i klinicznych wyniki mogły dotyczyć mechanizmu oporności tylko na jeden lek z grupy *MDR* [10, 11, 114], przy indywidualnej oporności na który można rozpatrywać wiele mechanizmów nie związanych z *mdr 1*.

W innych badaniach [18, 79, 80, 85] sami autorzy rozważają czułość metod stosowanych do wykrywania ekspresji *mdr 1* i wyrażają pogląd, że nawet bardzo słaba ekspresja lub niewielkie zmniejszenie akumulacji leku, które w warunkach laboratoryjnych mogą nie

mieć większego znaczenia – w warunkach klinicznych mogą całkowicie wystarczać do wytworzenia oporności skutecznie ograniczającej możliwości leczenia.

### INNE MECHANIZMY OPORNOŚCI WIELOLEKOWEJ

Za słuszością wiązania *MDR* z układem *mdr 1 P-gp* i zmniejszoną akumulacją leku przemawia fakt, że w żadnej dotychczas przebadanej linii komórek wrażliwych nie stwierdzono zmian w ekspresji *mdr 1* ani zmniejszenia akumulacji leku [102]. Niemniej jednak mechanizmem tym nie można wyjaśnić wszystkich przypadków *MDR* [9, 83, 114] jak również dużego bogactwa cech składających się na fenotyp komórek *MDR* [8, 58, 97, 94, 114, 120] m.in. zmienionego metabolizmu glukozy [128], podwyższonej aktywności transferaz glutationu [75] czy zmian w spoczynkowych, błonowych potencjałach komórek [32]. Złożoność tego fenotypu nie mogła być wyjaśniona jednym tylko, stosunkowo prostym mechanizmem.

Prawdopodobnie więc *MDR* jest uzależniona głównie od ekspresji *mdr 1*, lecz mogą wchodzić w grę również inne mechanizmy, z których najbardziej prawdopodobne to:

- zmniejszony transport leków do wnętrza komórki [19, 69, [116],
- zmniejszone wiązanie leku do organelli komórkowych [10, 11],
- zmienione rozmieszczenie leku pomiędzy jądrem komórkowym a cytoplazmą na korzyść cytoplazmy [59, 69, 77],
- zmiany w rozkładzie komórek w cyklu komórkowym (zmniejszenie frakcji proliferacyjnej) [114],
- zmiany metabolizmu  $Ca^{2+}$  i jego rozmieszczenia w komórce [77, 97],
- zmiany w układzie naprawczym DNA [114],
- zmieniona aktywność topoizomery II [105, 130, 131],
- zwiększona aktywność enzymów detoksykacyjnych, głównie S-transferaz glutationu [5, 36, 71, 75, 109].

Wszystkie te mechanizmy mogłyby być zaangażowane jednocześnie lub naprzemiennie w powstawanie fenotypu *MDR* przynajmniej w niektórych przypadkach. Udowodnienie tych zależności wymaga jednak dalszych badań. Istnienie wymienionych mechanizmów w komórkach *MDR* nie wyklucza jednak działania układu: *mdr 1 P-gp* – obniżona akumulacja leku jako jednego z podstawowych mechanizmów *MDR*, którego działanie i współzależności potwierdzono w wielu omówionych już badaniach. Dowody te wskazują na możliwość zastosowania dotychczas posiadanych wiadomości w praktyce klinicznej, w diagnostyce i leczeniu nowotworów opornych na chemioterapię.

### WYKRYWANIE KOMÓREK OPORNYCH

Wykrywanie komórek opornych w materiale pobranym od pacjentów można przynajmniej w części przypadków oprzeć na określeniu stopnia amplifikacji lub ekspresji genu *mdr 1*. Badania takie były już stosowane i wykazały dużą zgodność z kliniczną podatnością na leczenie [18, 43, 78]. Badaniem o większej czułości niż immunofluorescencyjna ocena poziomu *P-gp* przy użyciu przeciwciał monoklonalnych [67, 78] jest określenie poziomu *mdr 1* mRNA metodą *Northern blot* [91], natomiast ilościowo dokładniejszą ocenę *P-gp* zapewnia zastosowanie przeciwciał monoklonalnych w cytofluorometrii przepływowej albo technice *Western blot* [39]. Przydatność badania stopnia akumulacji leku w komórkach nowotworowych metodami radioizotopowymi albo z zastosowaniem cytofluorometrii

przepływową została również udowodniona, a pierwsze próby zastosowania jej w praktyce już podjęte [106].

### PRZELAMYWANIE OPORNOŚCI WIELOLEKOWEJ

W przypadkach, w których udowodniono zależność fenotypu *MDR* od układu *mdr* 1 *P-gp*, celowe jest stosowanie środków mogących wpływać hamująco na działanie tego układu. Najbardziej logiczną metodą byłoby zastosowanie przeciwciał monoklonalnych przeciw *P-gp*. Takie przeciwciała mogą uszkadzać pompę P-glikoproteinową [21, 55], a w połączeniu z toksynami – niszczyć całe komórki odporne [40]. Na przeszkodzie stoi jednak brak informacji, w jakim stopniu przeciwciała te mogą atakować komórki prawidłowe cechujące się wysokim poziomem *P-gp* [91].

Inną metodą mogłoby być zastosowanie nieswoistych substancji o charakterze lipofilnym (np. erytromycyna) [60] lub czynników aktywnych błonowo (np. walinomycyna) [34]. Podstawą takiego podejścia, które nie znalazło jeszcze odzwierciedlenia w praktyce, są szczególne właściwości błony komórek *MDR*: różnice w składzie lipidów i potencjałów błonowych w porównaniu z komórkami wrażliwymi.

Najbardziej jednak rozpowszechnionym sposobem jest poszukiwanie substancji, które by w drodze konkurencji z cząsteczkami leków wysycaly wiązania w układzie transportowym *P-gp* (rys. 2) nie pozwalając na usuwanie leków z komórki. Do tak działających substancji należą wspomniane już blokery kanałów wapniowych, np. werapamil (*VRP*) [77, przegląd – 4], rezerpina [93], chinidyna [77, 103], inhibitory kalmoduliny [88, 103], cyklosporyna A [26, 87], niektóre analogi cytostatyków, które nie mają działania onkostatycznego i nie konkurują o wiązanie z docelowymi strukturami DNA [26], oraz wiele innych jak amniodaron, tamoxifen.

W badaniach laboratoryjnych *VRP* okazał się bardzo skuteczny. Mechanizm tego działania w *MDR* nie jest jeszcze dokładnie poznany, wiadomo jednak, że nie polega on na blokowaniu kanałów wapniowych [54, 62, 72], lecz na innych mechanizmach, takich jak hamowanie wiązania leków do *P-gp* [56] lub zmiana stopnia jej fosforylacji [38].

Badania *in vivo* na zwierzętach [63] (przegląd [35]) wykazały znaczną poprawę reaktywności nowotworu na cytostatyki z grupy *MDR* po dodaniu *VRP* oraz przedłużenie czasu przeżycia zwierząt. Nieliczne dotychczas próby kliniczne są ograniczone ze względu na kardiotoksyczność skutecznych dawek *VRP* [53, 89]. Obiecujące są próby zastosowania mniej kardiotoksycznego odpowiednika *VRP* – Norverapamilu [81] lub wzmaganie działania *VRP* przez równoczesne działanie przeciwciał monoklonalnych przeciw *P-gp* [21]. Natomiast w przypadkach, w których nie stwierdza się ekspresji *P-gp*, werapamil nie znosi oporności, co świadczy o innym mechanizmie powstawania *MDR* w tych przypadkach [9, 25] i konieczności zastosowania innej strategii leczenia.

Z problemem kardiotoksyczności spotykają się również badania nad chinidyną [77, 103]. Być może bardziej właściwy będzie tu jej mniej toksyczny odpowiednik – chinina.

Obiecujące było odkrycie, że cyklosporyna A działa również hamująco na pompę P-glikoproteinową, zwłaszcza że ten lek, nawet w dużych dawkach, nie ma działania toksycznego [70, 87]. Jednakże jego działanie immunodepresyjne nie jest pożądane w chorobach nowotworowych, które często kojarzą się z upośledzeniem funkcji układu odpornościowego.

W opracowanym ostatnio modelu "modulatorów" P-glikoproteiny stwierdzono, że dla wiązania z cząsteczką P-gp niezbędny jest odpowiedni układ pierścieni aromatycznych i podstawowego atomu azotu [93]. Idealnym więc modulatorem MDR byłaby substancja spełniająca warunek odpowiedniej budowy chemicznej, słabo wiążąca się z białkami osocza, słabo toksyczna dla prawidłowych tkanek i osiągająca in vivo stężenie efektywne takie jak w warunkach in vitro. Odkrycie takiej substancji rozwiązałoby być może problem oporności MDR zależnej od *mdr 1* i umożliwiło skuteczne leczenie cytostatyczne przynajmniej u części pacjentów z chorobami nowotworowymi.

## PIŚMIENNICTWO

- [1] AKIYAMA SI, FOJO A, HANOVER JA, PASTAN L, GOTTESMAN MM. Isolation and genetic characterization of human KB cell lines resistant to multiple drugs. *Somatic Cell Mol Genet* 1985; 11: 117–126.
- [2] AMES GF-L. Bacterial periplastic transport systems: structure, mechanism and evolution. *Ann Rev Biochem* 1986; 55: 397–425.
- [3] ARCECI RJ, CROOP JM, HORVITZ SB, HOUSMAN D. The gene encoding multidrug resistance is induced and expressed at high levels during pregnancy in the secretory epithelium of the uterus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85: 4350–4354.
- [4] BAEYEUS JM. Interactions between calcium channel blockers and non-cardiovascular drugs: interactions with anticancer drugs. *Pharmacol Toxicol* 1988; 63: 1–7.
- [5] BATIST G, TULPUL A, SINHA BK, KATKI AG, MEYERS CH, COWAN KH. Overexpression of a novel anionic glutathione transferase in multidrug resistant human breast cancer cells. *J Biol Chem* 1986; 261: 15544–15549.
- [6] BECK-HANSON NT, TILL JE, LING V. Pleiotropic phenotype of colchicine-resistant CHO cells: cross resistance and collateral sensitivity. *J Cell Physiol* 1976; 88: 23–32.
- [7] BECK WT. The cell biology of multiple drug resistance. *Biochem Pharmacol* 1987; 36: 2879–2887.
- [8] BECK WT, CIRTAIN MC, ASHMUN RA, MIRRO J. Differentiation and the multiple drug resistance phenotype in human leukemic cells. *Cancer Res* 1986; 46: 4571–4575.
- [9] BECK WT, CIRTAIN MC, DANKS MK, FELSTED RL, SAFA AR, WOLVERTON JS, PARKER SUTTLE D, TRENT JM. Pharmacological, molecular and cytogenetic analysis of atypical multidrug-resistant human leukemic cells. *Cancer Res* 1987; 47: 5455–5460.
- [10] BECK WT, CIRTAIN MC, LEFKO JL. Energy dependent reduced drug bindings as a mechanism of *Vinca* alkaloid resistance in human leukemic lymphoblasts. *Mol Pharmacol* 1983; 24: 485–492.
- [11] BECK WT, CIRTAIN MC, LOOK AT, ASHMUN RA. Reversal of *Vinca* alkaloid resistance but not multiple drug resistance in human leukemic cells by verapamil. *Cancer Res* 1986; 46: 778–784.
- [12] BECK WT, DANKS MK, CIRTAIN MC, van HEININGEN JN. Crossresistance patterns and antigen expression in *Vinca* alkaloid – and other multiple drug – resistant human leukemic cell lines. [w] *Cancer Drug Resistance* (Wyd.) Alan R. Liss Inc. 1986: 3–10.
- [13] BELL DR, GERLACH GH, KARTNER N, BUICK RN, LING V. Detection of P-glycoprotein in ovarian cancer: a molecular marker associated with multidrug resistance. *J Clin Oncol* 1985; 3: 311–315.
- [14] BELL DR, TRENT JM, WILLARD HF, RIORDAN JR, LING V. Chromosomal location of human P-glycoprotein gene sequences. *Cancer Genet Cytogenet* 1987; 25: 141–148.
- [15] BIEDLER JL, RIEHM H. Cellular resistance to actinomycin D in Chinese hamster cells in vitro: cross resistance, radioautographic and cytogenetic studies. *Cancer Res* 1970; 30: 1174–1184.
- [16] BENARD J, DA SILVA J, TEYSSIER JR, RIOU G. Over-expression of *mdr1* gene with no DNA amplification in a multiple-drug-resistant human ovarian carcinoma cell line. *Int J Cancer* 1989; 43: 471–477.
- [17] BORST P. DNA amplification and multidrug resistance. *Nature* 1984; 309: 580.
- [18] BOURHIS J, GOLDSTEIN LJ, RIOU G, PASTAN I, GOTTESMAN MM, BENARD J. Expression of a human multidrug resistance gene in ovarian carcinomas. *Cancer Res* 1989; 49: 5062–5065.
- [19] BRADLEY G, JURANKA PF, LING V. Mechanism of multidrug resistance. *Biochim Biophys Acta* 1988; 948: 87–128.

- [20] BRADLEY G, NAIK M, LING V. P-glycoprotein expression in multidrug-resistant human ovarian carcinoma cell lines. *Cancer Res* 1989; **49**: 2790–2796.
- [21] BROXTERMAN HJ, KUIPER CM, SCHUURHUIS GJ, TSURNO T, PINEDO HM, LANKELMA J. Increase of daunorubicin and vincristine accumulation in multidrug resistant human ovarian carcinoma cells by a monoclonal antibody reacting with P-glycoprotein. *Biochem Pharmacol* 1988; **37**: 2389–2393.
- [22] BUSHER, TUMMLER B, RIORDAN JR, CANO-GAUCI DF. Preparation and utility of a radioiodinated analogue of daunomycin in the study of multidrug resistance. *Mol Pharmacol* 1989; **35**: 414–421.
- [23] CALLEN DF, BAKER E, SIMMERS RN, SESHARDI R, RONINSON IB. Localization of the human multiple drug resistance gene, *mdr1* to 7q21, 1. *Hum Genet* 1987; **77**: 142–144.
- [24] CHEN CJ, CHIN JE, UEDA K, CLARK DP, PASTAN I, GOTTESMAN MM, RONINSON IB. Internal duplication and homology with bacterial transport proteins in the *mdr 1* (P-glycoprotein) gene from multidrug-resistant human cells. *Cell* 1986; **47**: 381–389.
- [25] COLE SPC, DOWNES HF, SLOVAK ML. Effect of calcium antagonists on the chemosensitivity of two multidrug-resistant human tumour cell lines which do not overexpress P-glycoprotein. *Brit J Cancer* 1989; **59**: 42–46.
- [26] COLEY HM, TWENTYMAN PR, WORKMAN P. Identification of anthracyclines and related agents that retain preferential activity over adriamycin in multidrug-resistant cell lines and further resistance modification by verapamil and cyclosporin A. *Cancer Chemother Pharmacol* 1989; **24**: 284–290.
- [27] CORNWELL MM, GOTTESMAN MM, PASTAN I. Increased vinblastine binding to membrane vesicles from multidrug resistant KB cells. *J Biol Chem* 1986; **261**: 7921–7928.
- [28] CORNWELL MM, PASTAN I, GOTTESMAN MM. Certain calcium channel blockers bind specifically to multidrug-resistant human KB carcinoma membrane vesicles and inhibit drug binding to P-glycoprotein. *J Biol Chem* 1987; **262**: 2166–2170.
- [29] CORNWELL MM, SAFE AR, FELSTED RL, GOTTESMAN MM, PASTAN I. Membrane vesicles from multidrug-resistant cancer cells contain a specific 150 to 170 kDa protein detected by photoaffinity labelling. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; **83**: 3847–3858.
- [30] CORNWELL MM, TSUMO T, GOTTESMAN MM, PASTAN I. ATP-binding properties of P-glycoprotein from multidrug-resistant KB cells. *FASEB J* 1987; **1**: 51–54.
- [31] COWAN KH, BATIST G, TULPUL A, SUHA BK, MYERS CE. Similar biochemical changes associated with multidrug resistance in human breast cancer cells and carcinogen-induced resistance to xenobiotics in rats. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; **83**: 9328–9332.
- [32] CUPTA S, VAYUVEGULA B, SWEET P, STUPECKY M, MURRAY S, JACOBS R, SLATER MN. Membrane potential changes associated with pleiotropic drug resistance. *Clin Res* 1986; **34**: 881 A.
- [33] DAHLLOF B, MARTINSSON T, LEVAN G. Pleiotropic drug resistance protein overexpression and cytogenetic signs of gene amplification in mouse tumor cells. *Anticancer Res* 1986; **6**: 579–582.
- [34] DAOUD SS, JULIANO RL. Modulation of doxorubicin resistance by valinomycin (NSC 122023) and liposomal valinomycin in Chinese hamster ovary cells. *Cancer Res* 1989; **49**: 2661–2667.
- [35] DEUCHERS KL, LING V. P-glycoprotein and multidrug resistance in cancer chemotherapy. *Seminars in Oncol* 1989; **16**: 156–165.
- [36] deVRIES EGE, MELJER C, TIMMER-BOSSCHA H, BERENDSEN HH, deLEIJ L, SCHEPER RJ, MULDER NH. Resistance mechanisms in three human small cell lung cancer cell lines established from one patient during clinical follow-up. *Cancer Res* 1989; **49**: 4175–4178.
- [37] ENDICOTT JA, JURANKA PF, SORANGI F, GERLACH JM, DEUCHERS KL. Simultaneous expression of two P-glycoprotein genes in drug sensitive Chinese hamster ovary cells. *Mol Cell Biol* 1987; **7**: 4075–4081.
- [38] ENDICOTT JA, LING V. The biochemistry of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance. *Ann Rev Biochem* 1989; **58**: 137–171.
- [39] EPSTEIN J, XIAO H, OBA BK. P-glycoprotein expression in plasma cell myeloma is associated with resistance to VAD. *Blood* 1989; **74**: 913–917.
- [40] FITZGERALD DJP, WILLINGHAM MC, CARDAVELLI CO, TSUMO T, HANADA T, GOTTESMAN MM, PASTAN I. A monoclonal antibody *Pseudomonas*-toxin conjugate that specifically kills multidrug resistant cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; **84**: 4288–4292.
- [41] FOJO A, AKIYAMA S, GOTTESMAN MM, PASTAN I. Reduced drug accumulation in multiple drug-resistant human KB carcinoma cell lines. *Cancer Res* 1985; **45**: 3002–3007.
- [42] FOJO A, SHEN DW, MICKBEY LA, PASTAN I, GOTTESMAN MM. Intrinsic drug cancer resistance in human kidney cancer is associated with expression of a human multidrug resistance gene. *J Clin Oncol* 1987; **5**: 1922–1927.



- [43] FOJO AT, UEDA K, SLAMON DJ, POPLACK DG, GOTTESMAN MM, PASTAN I. Expression of a multidrug resistance gene in human tumors and tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; **84**: 265–269.
- [44] FOJO AT, WHANG-PENG J, GOTTESMAN MM, PASTAN I. Amplification of DNA sequences in human multidrug resistant KB carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; **82**: 7661–7665.
- [45] FRICHE E, SKOVSGAARD T, DANO K. Multidrug resistance: Drug extrusion and its counteraction by chemosensitizers. *Europ J Haemat Suppl.* 1989; **48**, 42: 59–67.
- [46] GERLACH JH, ENDICOTT JA, JURANKA PF, HENDERSON G, SARANGI F, DEUCHERS KL, LING V. Homology between P-glycoprotein and a bacterial haemolysin transport protein suggest a model for multidrug resistance. *Nature* 1986; **324**: 485–489.
- [47] GREENBURGER LM, LOTHSTEIN L, WILLIAMS SS, HORVITZ SB. Distinct P-glycoprotein precursors are overproduced in independently isolated drug-resistant cell lines. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; **85**: 3762–3766.
- [48] GROS P, CROOP J, HOUSMAN DE. Mammalian multidrug resistance gene: complete gene sequence indicates strong homology to bacterial transport protein. *Cell* 1986; **47**: 371–380.
- [49] GROS P, CROOP J, RONINSON I, VARSHAVSKY A, HOUSMAN DE. Isolation and characterization of DNA sequences amplified in multidrug-resistant hamster cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; **83**: 337–341.
- [50] GROS P, FALLOWS DA, CROOP JM, HOUSMAN DE. Chromosome mediated gene transfer of multidrug resistance. *Mol Cell Biol* 1986; **6**: 3785–3790.
- [51] GROS P, NERLAH YB, CROOP JM, HOUSMAN DE. Isolation and expression of a complementary DNA that confers multidrug resistance. *Nature* 1986; **323**: 728–731.
- [52] GROS P, RAYMOND M, BELL J, HOUSMAN D. Cloning and characterization of a second number of the mouse mdr gene family. *Mol Cell Biol* 1988; **8**: 2770–2778.
- [53] GRUBER A, REIZENSTEIN P, PETERSON C. Effect of Verapamil in vitro and in vivo on the accumulation of vincristine in leukemic cells from patients with low malignant lymphoma. *Anticancer Res* 1989; **9**: 9–12.
- [54] HAMADA H, HAGIWARA K, NAKAJIMA T, TSUMO T. Phosphorylation of the Mr 170 000 to 180 000 glycoprotein specific to multidrug-resistant tumor cells: effect of verapamil, trifluoperazine and phorbol esters. *Cancer Res* 1986; **47**: 7785–7789.
- [55] HAMADA H, TSUMO T. Functional role for the 170 to 180 kDa glycoprotein specific to drug-resistant tumor cells as revealed by monoclonal antibodies. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; **83**: 7785–7789.
- [56] HAMADA H, TSUMO T. Characterization of the ATP-ase activity of the Mr 170 000 to 180 000 membrane glycoprotein ( P-glycoprotein) associated with multidrug resistance in K562/ADM cells. *Cancer Res* 1988; **48**: 4926–4932.
- [57] HAMMOND JR, JOHNSTONE RM, GROS P. Enhanced efflux of <sup>3</sup>H/vinblastine from Chinese hamster ovary cells transfected with a full-length complementary DNA clone for the mdr1 gene. *Cancer Res* 1989; **49**: 3867–3871.
- [58] HILL AB, BECK WT, TRENT JM. Cytogenetic and molecular characterization of tumors in nude mice derived from a multidrug-resistant human leukemia cell line. *Cancer Res* 1988; **48**: 393–398.
- [59] HINDENBURG A, BAKER MA, GLESPER E, STEWART VJ, CASEN, TAUB RN. Effect of Verapamil and other agents on the distribution of anthracyclines and the reversal of drug resistance. *Cancer Res* 1987; **47**: 1421–1425.
- [60] HAFSLI E, NISSEN-MEYER J. Effect of erythromycin and tumor necrosis factor on the drug resistance of multidrug-resistant cells; reversal of drug resistance by erythromycin. *Int J Cancer* 1989; **43**: 520–525.
- [61] HORIO M, GOTTESMAN MM, PASTAN I. ATP-dependent transport of vinblastine in vesicles from human multidrug-resistant cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; **85**: 3580–3584.
- [62] HUET S, ROBERT J. The reversal of doxorubicin resistance by verapamil is not due to an effect on calcium channels. *Int J Cancer* 1988; **41**: 283–286.
- [63] LUCE P, APPLETON DR, FINNEY KJ, MOORGHEN M, SUNTER JP, WATSON AJ. Verapamil sensitizes normal and neoplastic rodent intestinal tissues to the stathmokinetic effect of vincristine in vivo. *Br J Cancer* 1988; **57**: 348–352.
- [64] JULIANO RL, LING V. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochim Biophys Acta* 1976; **455**: 152–162.
- [65] KAMIVATARI M, NAGATA Y, KIKUCHI H, YOSHIMURA A, SUMIZAWA T, AHUDO N, SAKODA R, SETO K, AKIYAMA S. Correlation between reversing of multidrug resistance and inhibiting of (<sup>3</sup>H)azidopine photolabelling of P-glycoprotein by newly synthesized dihydropyridine analogues in a human cell line. *Cancer Res* 1989; **49**: 3190–3195.

- [66] KANAMARA H, KAKEHI Y, YOSHIDA O, NAKANISHI S, PASTAN I, GOTTESMAN MM. Mdr1 RNA levels in human renal cell carcinoma: correlation with grade and prediction of reversal of doxorubicin resistance by quinidine in tumor explants. *J Natl Cancer Inst* 1989; **81**: 844–849.
- [67] KARTNER N, EVERDNER-PORELLE D, BRADLEY G, LING V. Detection of P-glycoprotein in multidrug-resistant cell lines by monoclonal antibodies. *Nature* 1985; **316**: 820–823.
- [68] KARTNER N, RIORDAN JR, LING V. Cell surface P-glycoprotein is associated with multidrug-resistance in mammalian cell lines. *Science* 1983; **221**: 1285–1288.
- [69] KEIZER HG, SCHURRHUIS GJ, BROXTENMAN HJ, LANKELMA J, SCHOONEN GEJ, van RIJN J, PINEDO HM, JOENJEH. Correlation of multidrug resistance with decreased drug accumulation, altered subcellular drug distribution and increased P-glycoprotein expression in cultured SW-1573 human lung tumor cells. *Cancer Res* 1989; **49**: 2988–2993.
- [70] KESSEL D. Circumvention of resistance to anthracyclines by calcium antagonists and other membrane-perturbing agents. *Cancer Surveys* 1986; **5**: 109–127.
- [71] KRAMER RA, ZAKHEV J, KIM G. Role of the glutathione redox cycle in acquired and de novo multidrug-resistance. *Science* 1988; **241**: 694–696.
- [72] LEE SC, DEUTSCH C, BECK WT. Comparison of ion channels in multidrug-resistant and sensitive human leukemic cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; **85**: 2019–2023.
- [73] LING V, KARTNER N, SUDO T, SIMINOVITCH L, RIORDAN JR. The multidrug resistance phenotype in Chinese hamster ovary cells. *Cancer Treat Rep* 1983; **67**: 869–874.
- [74] LING V, THOMPSON LH. Reduced permeability in CHO cells as a mechanism of resistance to colchicine. *J Cell Physiol* 1973; **83**: 103–116.
- [75] LYON RC, COHEN JS, FAUSTINO PJ, MEGNIN F, MYERS CE. Glucose metabolism in drug-sensitive and drug-resistant human breast cancer cells monitored by Magnetic Resonance Spectroscopy. *Cancer Res* 1988; **48**: 870–878.
- [76] MA DOF, SCURR RD, DAVEY RA. Detection of multidrug resistant phenotype in acute non lymphoblastic leukaemia. *Lancet* 1987; **1**: 135–137.
- [77] MARIANI M, PROSPERI E, COLOMBO A, SCIPINO R. Doxorubicin resistance circumvention by Verapamil in B 16 Melanoma cells. *Anticancer Res* 1989; **9**: 29–32.
- [78] MARX J. Drug resistance of cancer cells probed. *Science* 1986; **234**: 818–820.
- [79] MATTERN J, EFFERTH T, BAK M, HO AD, VOLM M. Detection of P-glycoprotein in human leukemias using monoclonal antibodies. *Blut* 1989; **58**: 215–217.
- [80] MERKEL DR, FUQUA SAW, HILL SM, McGUIRE WL. P-glycoprotein gene amplification or overexpression is not detected in clinical breast cancer specimens. (w) Prediction of response to Cancer Therapy. (Wyd.) Alan R. Liss Inc 1988: 61–73.
- [81] MERRY S, FLANIGAN P, SCHLICK E, FRESHNEY RI, KAYE SB. Inherent adriamycin resistance in a murine tumour line: circumvention with verapamil and norverapamil. *Brit J Cancer* 1989; **59**: 895–897.
- [82] MEYERS MB, RITTMANN-GRAUER L, O'BRIAN JP, SAFA AR. Characterization of monoclonal antibodies recognizing a Mr 180 000 P-glycoproteins in multidrug-resistant human tumor cells. *Cancer Res* 1989; **49**: 3209–3214.
- [83] MIRSKI SEL, GERLACH JH, COLE SPC. Multidrug resistance in a human small cell lung cancer line selected in adriamycin. *Cancer Res* 1987; **47**: 2594–2598.
- [84] MOSCOW JA, COWAN KH. Multidrug resistance. *J Natl Cancer Inst* 1988; **80**: 14–20.
- [85] MOSCOW JA, FAIRCHILD CR, MADDEN MJ, RAUSONS DT, WIEAUD HS, O'BRIEN EE, POPLACK DG, COSSMAN J, MYERS CE, COWAN KH. Expression of anionic glutathione-S-transferase and P-glycoprotein genes in human tissues and tumours. *Cancer Res* 1989; **49**: 1422–1428.
- [86] NAITO M, HAMADA H, TSUMO T. ATP/Mg<sup>2+</sup>-dependent binding of vincristine to the plasma membrane of multidrug resistant K562 cells. *J Biol Chem* 1988; **263**: 11887–11891.
- [87] NOOTER K, OOSTRUM R, JANKER R, van DEKKEN H, STOKOLJIK W, van den ENGH G. Effect of cyclosporin A on daunorubicin accumulation in multidrug-resistant P-388 leukemia cells measured by real-time flow cytometry. *Cancer Chemother Pharmacol* 1989; **23**: 296–300.
- [88] NWANKWOALA RNP, WEST WL. Calmodulin and alpha-tocopherol as additional binding sites for doxorubicin. *Cancer Chemother Pharmacol* 1986; **16**: 133–138.
- [89] OZOLS RF, CUNNION RE, KLECKER RW, HAMILTON TC, OSTHEGA Y, PARILLO JE, YOUNG R. Verapamil and adriamycin in the treatment of drug-resistant ovarian cancer patients. *J Clin Oncol* 1987; **5**: 642–647.
- [90] PASTAN I, GOTTESMAN MM. Multiple drug resistance in human cancer. *N Eng J Med* 1987; **316**: 1388–1393.

- [91] PASTANI, GOTTESMAN MM. Molecular biology of multidrug resistance in human cells. [w] Important Advances in Oncology. Philadelphia: JB Lippincott Company 1988:3-16.
- [92] PAUVELS-VERGELY C, POUPON MF. Chlorozotocin-induced selection of autocrine and multidrug-resistant variants from a rat rhabdomyosarcoma. *Anticancer Res* 1988; **8**: 137-144.
- [93] PEARCE HL, SAFA AR, BACH NJ, WINTER MA, CERTAIN MC. Essential features of the P-glycoprotein pharmacophore as defined by a series of reserpine analogs that modulate multidrug resistance. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; **86**: 5128-5132.
- [94] RAINCH A, GLAUBIGER D, WEINTRAUB H. Differences in lipid composition of doxorubicin-sensitive and resistant P388 cells. *Cancer Treat Rep* 1984; **68**: 637-641.
- [95] RIORDAN JR, DEUCHARS K, KARTNER N, ALON N, TREUT J, LING V. Amplification of P-glycoprotein genes in multidrug-resistant mammalian cell lines. *Nature* 1985; **316**: 817-819.
- [96] RIORDAN JR, LING V. Genetic and biochemical characterization of multidrug resistance. *Pharmacol Ther* 1985; **28**: 51-75.
- [97] REEVE J, KOCH GLE, TWENTYMAN PR. Evidence that multidrug resistance in Chinese hamster ovary cells is associated with alterations in the endoplasmic reticulum *Brit J Cancer* 1987; **56**: 143-145.
- [98] REEVE JG, RABBITTS PH, TWENTYMAN PR. Amplification and expression of *mdr1* gene in a multidrug resistant variant of small cell lung cancer line NCI-H69. *Brit J Cancer* 1989; **60**: 335-342.
- [99] RONINSON IB. Detection and mapping of homologous, repeated and amplified DNA sequence by DNA renaturation in agarose gels. *Nucleic Acid Res* 1983; **11**: 5413-5431.
- [100] RONINSON IB. Molecular mechanism of multidrug resistance in tumor cells. *Clin Physiol Biochem* 1987; **5**: 140-151.
- [101] RONINSON IB, CHIN JE, CHOI K, GROS P, HOUSMAN DE, FOJO A, SHEN DW, GOTTESMAN MM, PASTAN I. Isolation of human *mdr* DNA sequences amplified in multidrug-resistant KB carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; **83**: 4538-4542.
- [102] RONINSON IB, SHEN DW, CHIN JE, CHOI K, FOJO A, SOFFIR R, RICHERT N, GROS P, HOUSMAN DE, GOTTESMAN MM, PASTAN I. Multidrug resistance in human cells. The role of the *mdr 1* gene. (w) Cellular and Molecular Biology of Tumors and Potential Clinical Applications (Wyd.) Alan R. Liss Inc 1988: 287-296.
- [103] ROSENTHAL SA, HAIT WN. Potentiation of DNA damage and cytotoxicity by calmodulin antagonists. *Yale J Biol Med* 1988; **61**: 39-49.
- [104] ROSS DD, ORDONEZ JV, JANECKIS CC, TESTA JR, THOMPSON BW. Isolation of highly multidrug resistant P 388 cells from drug sensitive P 388/s cells by flow cytometric cell sorting. *Cytometry* 1988; **9**: 359-367.
- [105] ROSS W, SULLIVAN DH, CHOW KC. Altered function of DNA topoisomerases as a basis for antineoplastic drug action. (w) VT deVita, S Helman, SA Rosenberg (red) Important Advances in Oncology. (wyd) JB Lippincott Co, 1988: 65-80.
- [106] ROSS DD, THOMPSON BW, ORDONEZ JV, JANECKIS CC. Improvement of flow-cytometric detection of multidrug resistant cells by cell-volume normalization of intracellular daunorubicin content. *Cytometry* 1989; **10**: 185-191.
- [107] SAFA AR, GLOVER CJ, MEYERS MB, BIEDLER JL, FELSTED RL. Vinblastine photoaffinity labelling of a high molecular weight surface membrane glycoprotein specific for multidrug resistant cells. *J Biol Chem* 1986; **261**: 6137-6140.
- [108] SAMUELS BL, LARSON RA, LE BEAN MM, DALY KM, BITTER MA, VARDIMAN JW, BARKER CM, ROWLEY JD, GOLOMB HM. Specific chromosomal abnormalities in acute nonlymphocytic leukemia correlate with drug susceptibility in vivo. *Leukemia* 1988; **2**: 79-83.
- [109] SATO K. Glutathione transferases as markers of preneoplasia and neoplasia. (w) Advances in Cancer Research. (Wyd) Academic Press Inc 1989; **52**: 205-255.
- [110] SCHMID FA, OTTER GM, HIVANO I. L1210 leukemia hybrids isolated after fusion of alkylating agent resistance sublines. *Leukemia Res* 1988; **12**: 67-70.
- [111] SCOTTO KW, BIEDLER JL, MELERA PW. Amplification and expression of genes associated with resistance in mammalian cells. *Science* 1986; **232**: 751-755.
- [112] SHEN DW, FOJO A, RONINSON IB, CHIN JE, SOFFIR R, PASTAN I, GOTTESMAN MM. Multidrug resistance of DNA-mediated transformants is linked to transfer of the human *mdr1* gene. *Mol Cell Biol* 1986; **6**: 4039-4044.
- [113] SIEGFRIED JM, TRITTON TR, SARTORELLI AC. Comparison of anthracycline concentrations in S 180 cell lines of varying sensitivity. *Europ J Cancer Clin Oncol* 1983; **19**: 1133-1141.

- [114] SONKA J, SCHOSSIG U, VOGT-SCHADEN M, VOLM H. Initial and early effects of adriamycin in murine sarcoma 180 cannot be restored in a resistant subline by increasing the uptake and external concentration of the drug. *Cancer Chemother Pharmacol* 1989; **24**: 33–40.
- [115] STAHL F, MARTINSSON T, DAHLLOF B, LEVAN G. Amplification and overexpression of the P-glycoprotein genes and differential amplification of three other genes in SEWA murine multidrug-resistant cells. *Hereditas* 1988; **108**: 251–258.
- [116] SUPINO R, MARIANI M, CAPRANICO G, COLOMBO A, PARMIANI G. Doxorubicin cellular pharmacokinetics and DNA breakage in a multidrug resistant B 16 melanoma cell line. *Br J Cancer* 1988; **57**: 142–146.
- [117] TEYSSIER JR, BARNARD J, FEVRE D, DASILVA J, RENAUD L. Drug related chromosomal changes in chemioresistant human ovarian carcinoma cells. *Cancer Genet Cytogenet* 1989; **39**: 35–43.
- [118] THORGEIRSSON SS, HUBER BE, SORRELL S, FOJO A, PASTANI, GOTTESMAN MM. Increased expression of the multidrug resistance (P-glycoprotein) gene during chemical hepatocarcinogenesis and in regenerating rat liver. *Science* 1987; **236**: 1120–1122.
- [119] TRENT JM, WITKOWSKI CM. Classification of the chromosomal assignment of the human P-glycoprotein/mdr1 gene: possible coincidence with the cystic fibrosis and c-met oncogene. *Cancer Genet Cytogenet* 1987; **26**: 187–190.
- [120] TSUMO T, IIDA H, KAWABATA H, TSUKAGOSHI S, SAKURAI Y. High calcium content of pleiotropic drug resistant P 388 and K562 leukemia and Chinese hamster ovary cells. *Cancer Res* 1984; **44**: 5095–5099.
- [121] UEDA K, CARDARELLI C, GOTTESMAN MM, PASTANI I. Expression of a full-length cDNA for the human MDR 1 gene confers resistance to colchicine, doxorubicin and vinblastine. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; **84**: 3004–3008.
- [122] UEDA K, CLARK DP, CHEN C, RONINSON IB, GOTTESMAN MM, PASTANI I. The human multidrug resistance (mdr 1) gene. *J Biocommun* 1987; **262**: 505–508.
- [123] UEDA K, CORNWELL MM, GOTTESMAN MM, PASTANI I, RONINSON B, LING V, RIORDAN JR. The mdr1 responsible for multidrug resistance codes for P-glycoprotein. *Biochem Biophys Res Commun* 1986; **141**: 956–962.
- [124] Van der BLIEK AM, BAAS F, TEN HOUTE de LANGE T, KOOIMAN PM, van den VELDE-KOERTS, BORST P. The human mdr3 gene encodes a novel P-glycoprotein homologue and gives rise to alternatively spliced mRNAs in liver. *EMBO J* 1987; **6**: 3325–3331.
- [125] VOLM M, BAK M, EFFERTH T, MATTERN J. Induced multidrug resistance in murine leukemia L1210 and associated changes in a surface-membrane glycoprotein. *J Cancer Res Clin Oncol* 1989; **115**: 17–24.
- [126] VOLM M, EFFERTH T, BAK M, HO ADMJ. Detection of the multidrug resistant phenotype in human tumours by monoclonal antibodies and the streptavidin – biotinylated phycoerythrin complex method. *Europ J Cancer Clin Oncol* 1989; **25**: 743–749.
- [127] VOLM M, EFFERTH T, BAK M, MATTERN J. Detection of drug resistance in human ovarian carcinoma. *Arch Gynecol Obstet* 1989; **244**: 123–128.
- [128] WILLINGHAM MC, CORNWELL MM, CARDARELLI CO, GOTTESMAN MM, PASTANI I. Single cell analysis of daunomycin uptake and efflux in multidrug resistant and sensitive KB cells: Effects of Verapamil and other drugs. *Cancer Res* 1986; **46**: 5941–5946.
- [129] WILLINGHAM MC, RICHERT ND, CORNWELL MM, TSUMO T, HAMADA H, GOTTESMAN MM, PASTANI I. Immunocytochemical localization of P170 at the plasma membrane of multidrug resistant human cells. *J Histochem Cytochem* 1987; **35**: 1451–1456.
- [130] WOVERTON J, DANKS MK, SCHMIDT CA, BECK WT. Genetic characterization of the multidrug-resistant phenotype of VM-26 resistant human leukemia cells. *Cancer Res* 1989; **49**: 2422–2426.
- [131] YALOWICH JC, ROBERTS D, BENTON S, PARGANAS E. Resistance to etoposide (VP-16) in human leukemia K 562 cells is associated with altered DNA topoisomerase II (ToPoII) activity and rapid reversal of drug induced DNA damage. *Proc Amer Assoc Cancer Res* 1987; **28**: 277.

Otrzymano: lipiec 1989,

Przyjęto: marzec 1990.

Adres autorki: ul K. Marcinkowskiego 1, 50-368 Wrocław

## UDZIAŁ KALMODULINY W PROCESACH REGULACJI PROLIFERACJI KOMÓREK\*

### CALMODULIN IS INVOLVED IN REGULATION OF CELL PROLIFERATION PROCESSES

Beata WÓJCIAK

Zakład Biologii Komórki, Instytut Biologii Molekularnej im. J. Zurzyckiego,  
Uniwersytet Jagielloński, Kraków

*Streszczenie.* Kalmodulina – powszechnie występujące w komórkach *Eucariota* białko wiążące wapń, jest regulatorem wielu procesów zależnych od jonów wapnia. Kalmodulina w kompleksie z jonami  $Ca^{2+}$  odgrywa ważną rolę w regulacji cyklu komórkowego, szczególnie w późnej fazie  $G_1$  oraz w czasie opuszczania przez komórki fazy stacjonarnej  $G_0$ . Podczas mitozy kompleksy kalmodulina-wapń wraz z białkami regulacyjnymi mikrotubul i mikrofilamentów wpływają na funkcjonowanie wrzeciona podziałowego i filamentów aktomiozynowych w bruzdzie podziałowej. W artykule tym przedstawiono dane wskazujące na udział kalmoduliny w regulacji proliferacji komórek.

*Summary.* Calmodulin – the ubiquitous intracellular  $Ca^{2+}$ -binding protein mediates many of the  $Ca^{2+}$ -regulated events in the eucariotic cell. This protein has been proposed to play an important role in the regulation of the cell cycle, especially in the  $G_1/S$  transition and during reentry of stationary ( $G_0$ ) cells into the cell cycle. Calmodulin –  $Ca^{2+}$  complexes have also been reported to regulate the function of the mitotic spindle and actomyosin filaments during mitosis either by direct or indirect interaction with cytoskeleton-binding proteins.

*Wykaz stosowanych skrótów.* *CaM* – kalmodulina, *MT* – mikrotubule, *MF* – mikrofilamenty, cAMP – cykliczny adenozymonofosforan,  $G_0$  (ang. *Gap 0*) – faza stacjonarna,  $G_1$  (ang. *Gap 1*) – faza przerwy pierwszej,  $G_2$  – faza przerwy drugiej, *S* (ang. *synthesis*) – faza syntezy DNA.

## WSTĘP

Badania ostatnich lat potwierdziły hipotezę o roli jonów wapnia w regulacji aktywności podziałowej komórek. Już w latach siedemdziesiątych JF Whitefield [58], Rubin [38]

\*Praca częściowo finansowana w ramach problemu CPBP 04. 01. PAN

wykazali, że aktywność podziałowa wielu typów komórek prawidłowych uwarunkowana jest obecnością w pożywce jonów wapnia w ściśle określonym stężeniu. Obniżenie tego stężenia poniżej wartości krytycznej prowadzi do zahamowania wzrostu komórek prawidłowych w fazie  $G_1/S$  cyklu komórkowego [9, 17, 56]. W przypadku komórek transformowanych nowotworowo nawet drastyczne zmniejszenie stężenia jonów wapnia w pożywce tempa proliferacji ani nie zatrzymuje, ani nie ogranicza w istotnym stopniu. Jest to prawdopodobnie związane z utrzymywaniem przez te komórki kilkakrotnie wyższego niż w komórkach prawidłowych stężenia wolnych jonów  $Ca^{2+}$  w cytoplazmie [24, 37, 56].

Wzrost stężenia jonów wapnia w cytoplazmie komórek jest jedną z najwcześniej wykrywanych zmian zachodzących w następstwie działania czynników mitogennych na komórki pozostające przez dłuższy czas w fazie  $G_0$  [4, 28]. W złożonym systemie reakcji metabolicznych jony  $Ca^{2+}$ , podobnie jak cAMP, cGMP, trifosforan inozytoli i diacyloglicerol pełnią funkcję przekaźników II. rzędu. W cytoplazmie wapń wiązany jest specyficznie przez niskocząsteczkowe, kwaśne białka [4, 21, 32]. Stanowią one grupę efektorów przenoszących działanie jonów wapniowych na systemy docelowe w komórce [4, 24].

W ostatnich latach pojawiły się prace zakładające, że białka uczestniczące w przetwarzaniu sygnałów mitogennych i regulujące poziom wolnego wapnia w cytoplazmie mogą być regulatorami cyklu komórkowego [37, 44, 59]. Pierwszym wśród proponowanych białek tej klasy okazała się kalmodulina. O przypisywaniu jej specjalnej roli decydują następujące cechy:

- Kalmodulina występuje we wszystkich komórkach *Eucariota* i stanowi 0,1–1% całkowitej ilości białek komórkowych [36, 56].

- Jest głównym receptorem dla jonów wapnia w komórkach mięśni gładkich i komórkach niemięśniowych [14].

- Wiąże jony wapnia z wysokim powinowactwem, wiązanie to jest warunkiem jej aktywności [52, 56].

- Jest regulatorem wielu kluczowych procesów metabolicznych skorelowanych z aktywnością podziałową komórek, np.:

- reguluje metabolizm cyklicznych nukleotydów [14, 15, 61, 62],

- wpływa na poziom fosforylacji białek aktywując kinazy białkowe zależne od  $Ca^{2+}$  [14, 20, 47, 56],

- reguluje poziom wolnego wapnia w cytoplazmie [14, 56].

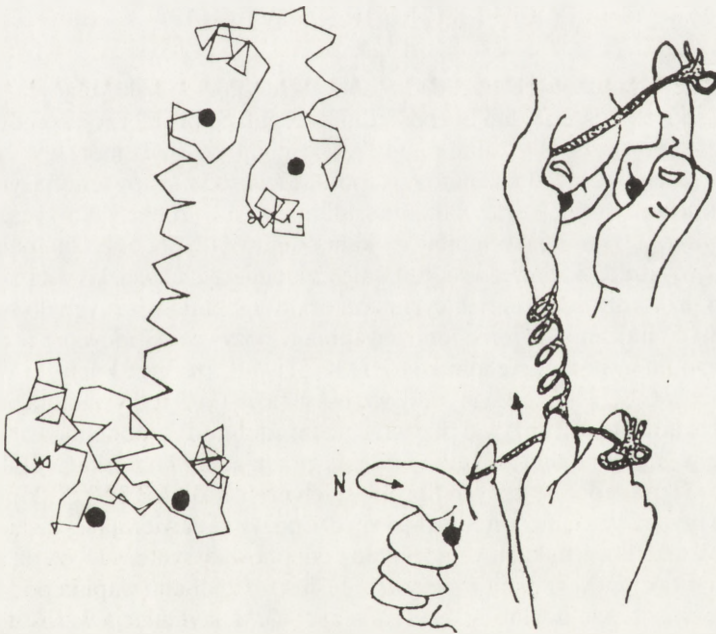
- Poziom kalmoduliny podlega wahaniom w zależności od fazy cyklu komórkowego i aktywności podziałowej komórek [9, 11, 56]. Komórki transformowane zawierają 2–10-krotnie więcej kalmoduliny niż komórki prawidłowe [10, 13, 24, 54].

W niniejszym artykule oprócz krótkiej charakterystyki budowy i funkcji kalmoduliny, przedstawiono argumenty przemawiające za przyjęciem hipotezy o udziale tego białka w regulacji cyklu komórkowego oraz omówiono niektóre z poglądów na temat mechanizmu takiej regulacji.

## BUDOWA KALMODULINY

Kalmodulina jest białkiem o masie cząsteczkowej 17 kDa, kwaśnym, o pI 4,3, termostabilnym. Zbudowana jest ze 148 reszt aminokwasowych tworzących jeden łańcuch polipep-

tydowy o dużej zawartości asparaginy, glutaminy i fenyloalaniny [14, 52]. Brak tryptofanu, cysteiny i hydroksyproliny przyczynia się do dużej "giętkości" cząsteczki. Kalmodulina wykazuje brak specyficzności tkankowej i gatunkowej oraz wysoki procent homologii z innymi białkami wiążącymi wapń, w szczególności z troponiną C z mięśni szkieletowych kręgowców (70% homologii) i parwalbuminami z mięśni ryb [14, 24, 52]. Badania krystalograficzne ujawniły istnienie w obrębie cząsteczki kalmoduliny czterech domen wiążących jony wapnia o  $K_D = 10^{-6}$  M (rys. 1). Ich struktura, opisana po raz pierwszy dla parwalbuminy, nazywana jest powszechnie *EF-hand*, ponieważ układ przestrzenny odcinków helikalnych w obrębie domeny przypomina układ palca wskazującego i kciuka prawej ręki ustawionych prostopadłe względem siebie [31]. Podobną konformację regionów wiążących jony wapniowe zidentyfikowano w większości poznanych dotąd białek tej grupy [24]. Domena *EF-hand*, zwana także "helisa-pętla-helisa" (ang. *helix-loop-helix*), zbudowana jest z ok. 30 aminokwasów tworzących dwa odcinki o konformacji helikalnej wzajemnie do siebie prostopadłe, połączone pętlą zawierającą 12 reszt aminokwasowych [52]. Po związaniu jonów wapnia cząsteczka kalmoduliny przechodzi szereg zmian konformacyjnych prowadzących do wzrostu zawartości struktur helikalnych łańcucha polipeptydowego i ekspozycji regionów hydrofobowych cząsteczki rozpoznawanych przez białka wiążące kalmodulinę i inhibitory tych oddziaływań [14, 52].



RYS. 1. Schemat budowy przestrzennej cząsteczki kalmoduliny; konformacja łańcucha polipeptydowego w obrębie domen wiążących jony wapnia (jony wapnia zaznaczono jako czarne kółka) nazywana jest *EF-hand* ze względu na ułożenie odcinków helikalnych przypominające układ palca wskazującego i kciuka prawej ręki ustawionych prostopadłe względem siebie (wg [48])

## LOKALIZACJA KALMODULINY

Badania nad rozmieszczeniem kalmoduliny w komórkach wykazały, że 50–90% zawartości tego białka znajduje się w cytoplazmie podstawowej, a pozostała część niemal we wszystkich strukturach subkomórkowych [39, 54]. Szczególnie dużo jej występuje w jądrze, w rejonie otoczki jądrowej i w obszarach zdekondensowanej chromatyny oraz w mitochondriach [2, 23, 39, 46]. Zaobserwowano, że w cytoplazmie podstawowej znakowana fluorescencyjnie kalmodulina "dekoruje" mikrotubule i filamenty aktomiozynowe (55, 63). Zjawisko to jest szczególnie dobrze widoczne podczas mitozy (porównaj poniżej rozdział: Mechanizm działania kalmoduliny). Wbrew oczekiwaniom wielu autorów rozmieszczenie kalmoduliny w komórce nie ulega widocznym zmianom ani pod wpływem stymulacji hormonalnej, ani w wyniku transformacji nowotworowej [10, 56]. Jedynie w niektórych typach komórek transformowanych zaobserwowano niewielki przyrost ilości wolnej kalmoduliny w cytoplazmie podstawowej w stosunku do kalmoduliny związanej ze strukturami subkomórkowymi [56].

## KALMODULINA JAKO BIAŁKO WPŁYWAJĄCE NA PRZEBIEG CYKLU KOMÓRKOWEGO

W wyniku przeprowadzonych badań opisano wiele zjawisk wskazujących na udział kalmoduliny, w sposób pośredni lub bezpośredni, w regulacji proliferacji komórek.

● Inhibitory specyficzne dla kalmoduliny zatrzymują wzrost komórek w fazie  $G_1/S$  cyklu komórkowego lub w metafazie mitozy. Lipofilne związki z grupy fenotiazyn (chloropromazyne, trifluoroperazyne) oraz naftalenosulfonamidów (znane jako związki *W*) są powszechnie wykorzystywane jako inhibitory kalmoduliny [12, 36, 56]. Chafouleas [12] i Rasmussen [44] wykazali, że nawet krótkotrwałe działanie tych związków na komórki w hodowli *in vitro* prowadzi do zaburzeń cyklu komórkowego analogicznych do tych, które powstają w wyniku obniżenia stężenia jonów wapnia w pożywce. Hodowane w obecności inhibitorów kalmoduliny komórki chomika CHO  $K_1$  [11, 12], szczurze komórki WISH [56] oraz mysie komórki C127 [44] zatrzymywały wzrost w fazie  $G_1/S$  lub w metafazie mitozy i dopiero usunięcie inhibitora z pożywki przywracało im zdolność do podejmowania syntezy DNA. Podobne wyniki otrzymał Boynton i Kleine pracując na komórkach epitelialnych wątroby T51B oraz preneoplastycznych fibroblastach mysich BALB 3T3 [5, 26]. Komórki te utrzymywano przez 2 tygodnie w hodowli *in vitro* w pożywce zawierającej niskie stężenie jonów wapnia. W takich warunkach komórki nie podejmowały syntezy DNA aż do chwili, gdy uzupełniono brak jonów wapnia w pożywce. Jeśli wraz z jonami wapnia podawano do hodowli inhibitory kalmoduliny lub przeciwciała anty-*CaM*, stymulacja wzrostu komórek nie następowała. Inkubacja komórek T51B i BALB 3T3 z czynnikami wywołującymi wzrost nowotworowy: estrami forbolu, sacharyną lub luminalem także nie wywoływała stymulacji wzrostu, gdy pożywkę wzbogacono uprzednio w związki blokujące aktywność kalmoduliny. Powyższe doświadczenia pozwalają na wyróżnienie co najmniej dwóch momentów w cyklu komórkowym, w których kalmodulina pełni istotną funkcję regulacyjną: przejście komórek z fazy  $G_1$  cyklu komórkowego do fazy *S* oraz metafaza.

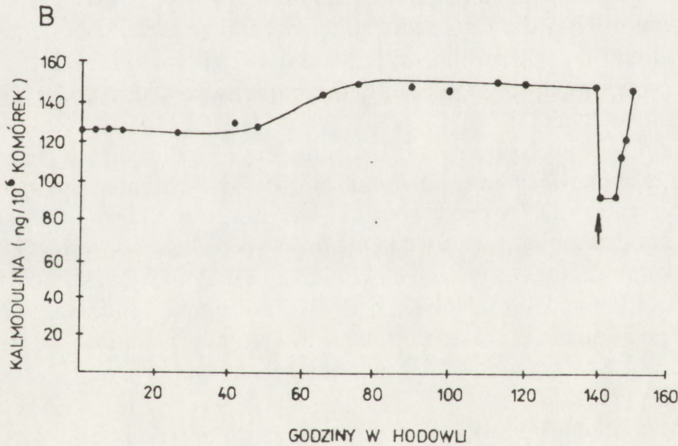
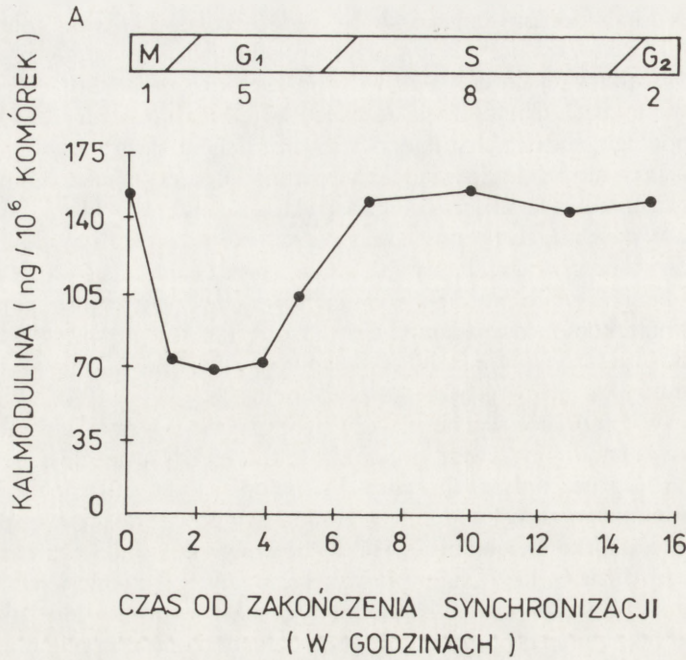


● Zawartość kalmoduliny zmienia się w sposób skokowy w tych momentach cyklu komórkowego, które uważa się za krytyczne dla regulacji wzrostu komórek. Kalmodulina stanowi 0,1–1% całkowitej ilości białek w komórkach *Eucariota*. Jak wykazały badania przeprowadzone przez J. Chafouleasa, A. Meansa i D. Rasmussena [12, 44, 56] poziom kalmoduliny podlega pewnym charakterystycznym zmianom podczas kolejnych faz cyklu komórkowego. Jako model do doświadczeń wybrano komórki jajnika chomika CHO K<sub>1</sub> ze względu na stosunkowo krótki czas generacji i łatwość przeprowadzania synchronizacji tych komórek. Wykazano, że bezpośrednio po mitozie poziom kalmoduliny wynosi 70 ng/10<sup>6</sup> komórek i utrzymywał stałą wartość prawie przez cały czas trwania fazy G<sub>1</sub>. Pod koniec tej fazy, bezpośrednio przed rozpoczęciem syntezy DNA, zaobserwowano podwojenie ilości wewnątrzkomórkowej kalmoduliny. Poziom ten utrzymywał się do fazy G<sub>2</sub> (rys. 2A). Kolejne doświadczenia wykazały, że skokowy przyrost ilości kalmoduliny wynika z selektywnej syntezy de novo tego białka pod koniec fazy G<sub>1</sub> [11, 42]. Podobny efekt zaobserwowano w komórkach regenerującej wątroby szczura i w mysich komórkach C127; wzrost poziomu kalmoduliny zawsze poprzedzał syntezę DNA, niezależnie od długości trwania fazy G<sub>1</sub>. Oprócz opisanych zmian J. Chafouleas [11, 12] zaobserwował także dwukrotny spadek poziomu kalmoduliny w komórkach opuszczających fazę G<sub>0</sub> i rozpoczynających cykl komórkowy. Komórki CHO K<sub>1</sub> utrzymywano w hodowli w dużej gęstości przez 140 godzin (faza G<sub>0</sub>). W ciągu pierwszej godziny po przeniesieniu komórek do hodowli o mniejszej gęstości poziom kalmoduliny obniżał się dwukrotnie, aby po 4 godzinach wrócić do poprzedniego poziomu. Po 8 godzinach komórki podejmowały syntezę DNA (rys. 2B). Ponieważ spadek zawartości kalmoduliny w komórkach poprzedzony był spadkiem poziomu mRNA dla *CaM*, zmianę tę wiązano ze skróceniem czasu życia tego mRNA [12]. Inni autorzy sugerowali, że kalmodulina, jak wiele innych białek, podlega ubikwitynizacji, ponieważ stwierdzono istnienie kompleksów, w których *CaM* jest związana kowalencyjnie z ubikwityną [3].

Na podstawie powyższych obserwacji J. Chafouleas i C. Rasmussen [12, 37] wysunęli przypuszczenie, że skokowe zmiany poziomu kalmoduliny są elementem sygnału decydującego o inicjacji syntezy DNA przez komórki lub progresji z fazy G<sub>0</sub> do fazy G<sub>1</sub> cyklu komórkowego. Zgodne z tym przypuszczeniem są wyniki doświadczeń, w których stosowano inhibitory kalmoduliny w dawkach unieczynnających połowę zawartości tego białka. Wykazano, że jeśli komórkom CHO K<sub>1</sub> będącym po mitozie poda się w takiej dawce inhibitor, sygnał podwojenia ilości kalmoduliny nie występuje i komórki zatrzymują wzrost w fazie G<sub>1</sub>/S [12, 36]. Stwierdzono także podobne zahamowanie progresji komórek CHO K<sub>1</sub> z fazy G<sub>0</sub> do G<sub>1</sub> [11, 12].

● Wykazano, że istnieje liniowa zależność między stężeniem kalmoduliny w komórkach a czasem trwania fazy G<sub>1</sub>. A. Means i C. Rasmussen [37, 44] przeprowadzili badania na klonalnych mysich liniach komórkowych przejawiających zdolność do nadprodukcji kalmoduliny lub wykazujących zahamowanie jej syntezy. Linie takie uzyskano przy użyciu metod inżynierii genetycznej w wyniku transfekcji mysich komórek C127 episomalnymi wektorami wirusa BPV (*bovine papilloma virus*). Otrzymano następujące typy komórek:

- komórki BPV z genomem zawierającym jedynie kopie wektora,
- komórki CM, do których wprowadzono minigen kalmoduliny z promotorem (wykazujące nadprodukcję kalmoduliny),



RYS 2. Poziom kalmoduliny w komórkach chomika CHO K1 (wg [12]): A – podczas kolejnych faz cyklu komórkowego, B – podczas przejścia komórek z fazy stacjonarnej  $G_0$  do fazy  $G_1$

– komórki MCM zawierające minigen kalmoduliny z promotorem zastąpionym przez promotor dla ludzkiej metalotioneiny II; w tych komórkach synteza kalmoduliny była uruchamiana przez metale ciężkie;

– komórki AS produkujące antisense mRNA dla kalmoduliny, wykazujące bardzo niski poziom syntezy tego białka;

– komórki PV, w których gen kalmoduliny zastąpiono genem innego białka wiążącego wapń – parwalbuminy.

W przypadku komórek CM, produkujących 2–4-krotnie więcej kalmoduliny niż komórki BPV lub C127, zaobserwowano skrócenie cyklu komórkowego wywołane skróceniem fazy  $G_1$ . C. Rasmussen i A. Means porównując parametry cyklu komórkowego i poziom kalmoduliny w sześciu klonalnych liniach komórkowych przenoszących minigen *CaM* oraz komórkach C127 wykazali, że istnieje liniowa zależność między wewnątrzkomórkowym stężeniem kalmoduliny a szybkością przechodzenia komórek przez fazę  $G_1$  (wsp. korelacji  $r = 0,994$ ). Wynik ten potwierdziły także doświadczenia wykonane na komórkach linii MCM. Aktywacja promotora metalothioneiny II przez wzbogacenie pożywki w jony  $Zn^{2+}$  wywoływała najpierw przejściowy wzrost poziomu mRNA dla *CaM*, a następnie ponad dwukrotny wzrost stężenia *CaM* w cytoplazmie. W efekcie tego, podobnie jak w poprzednim przypadku, zaobserwowano wzrost tempa proliferacji komórek. W komórkach AS, zawierających antisense cDNA dla *CaM*, produkcja *CaM* spadła do 40% wartości kontrolnej, co, jak należało oczekiwać, spowodowało 50-procentowy spadek tempa wbudowywania znakowanej tymidyny i całkowite zahamowanie proliferacji. Dalsze szczegółowe badania wykazały, że wzrost tych komórek został zatrzymany w metafazie podczas mitozy lub w fazie  $G_1/S$ . Można przypuszczać, że obserwowane efekty regulacyjne są specyficzne dla kalmoduliny, ponieważ w komórkach PV, wykazujących nadprodukcję innego białka wiążącego wapń – parwalbuminy, nie dostrzeżono żadnej z wymienionych zmian.

## MECHANIZM DZIAŁANIA KALMODULINY

W świetle przedstawionych faktów uzasadnione wydaje się założenie, że kalmodulina jest białkiem regulatorowym cyklu komórkowego, odgrywającym szczególną rolę przy przejściu komórek z fazy  $G_0$  do  $G_1$ ,  $G_1$  do  $S$  oraz w metafazie podczas mitozy. Trudno jest jednoznacznie odpowiedzieć na pytanie, jaki jest mechanizm tej regulacji, ponieważ kalmodulina jest białkiem wielofunkcyjnym mogącym jednocześnie wpływać na przebieg wielu kluczowych procesów metabolicznych (tab. 1). Przypuszcza się, że regulacyjne działanie kalmoduliny w metafazie polega na jej oddziaływaniu z cytoszkieletem komórki, a w szczególności z układem mikrotubul [19, 29, 51, 59, 60]. Potwierdzeniem tego są obserwacje C. Keitha [29], który wykazał, że wprowadzenie do komórek PtK<sub>2</sub> w prometafazie dodatkowej ilości kompleksów kalmodulina-wapń wywołuje wzmoczoną depolimeryzację mikrotubul, zaburzenia w ruchu chromosomów i znaczne opóźnienie anafazy. Ponieważ podawanie *CaM* lub buforu bez jonów wapnia nie powodowało żadnych zmian, wywnioskowano, że kalmodulina zwiększa wrażliwość mikrotubul na działanie jonów wapniowych. Do podobnego wniosku doprowadziły badania M. Marcuma [36] nad przebiegiem procesu polimeryzacji mikrotubul izolowanych z tkanki mózgowej bydła w buforach  $Ca^{2+}$ /EGTA. W obecności jonów  $Ca^{2+}$  w stężeniu  $0,3 \mu M$  proces polimeryzacji przebiegał z maksymalną szybkością i osiągał fazę plateau po 10 minutach. Dodanie oczyszczonej kalmoduliny do tego układu rozpoczynało proces szybkiej depolimeryzacji MT. Stan taki osiągnano wprawdzie także przez zwiększenie stężenia jonów wapnia bez obecności kalmoduliny, ale wymagana ilość jonów  $Ca^{2+}$  przekraczała znacznie zakres stężeń spotykany w komórkach ( $10^{-3} M$ ). Na podstawie tych wyników można oczekiwać, że w tych miejscach w komórce, gdzie znajdują się największe skupienia kalmoduliny, może

TABELA 1. Udział kalmoduliny w procesach związanych z regulacją aktywności podziałowej komórek (opis mechanizmu działania kalmoduliny zamieszczono w tekście)

Proces	Rola kalmoduliny	Piśmiennictwo
Regulacja stężenia wolnych jonów wapnia w cytoplazmie	aktywuje ATP-azę zależną od $Ca^{2+}$ i $Mg^{2+}$	26, 45
	reguluje uwalnianie jonów $Ca^{2+}$ z siateczki śródplazmatycznej	26
Regulacja metabolizmu cAMP i cGMP	aktywuje cyklazę adenylową	14, 15, 61
	i 3'5'fosfodiesterazę	62
Powstawanie prekursorów prostaglandyn	aktywuje fosfolipazę A <sub>2</sub>	14
Ekspresja genów cyklu komórkowego	aktywuje ekspresję genów: <i>cdc28</i> u drożdży, MPF u <i>Xenopus laevis</i> , <i>c-myc</i> w komórkach C127	37, 44
Inicjacja syntezy DNA	depolimeryzuje MT	9, 18, 19, 53
Translacja białek	aktywuje czynnik inicjujący translację eIF-2	60
	aktywuje syntetazę aminoacylo tRNA	60
	aktywuje kinazę białka rybosomalnego S6	8, 41
	aktywuje kinazę fosforylującą histony H <sub>1</sub> , H <sub>3</sub>	9, 60
Kondensacja chromatyny	depolimeryzuje MT wrzeczona	19, 20, 29, 47, 51, 59, 60
Ruch chromosomów	kariokinetycznego	
Skurcz MF w bruzdzie podziałowej	aktywuje kinazę lekkich łańcuchów miozyny	1, 60

zachodzić proces depolimeryzacji mikrotubul. W dzielącej się komórce, podczas metafazy, będzie to np. obszar centrioli i kinetochorów chromosomów [29, 51].

Kalmodulina może wpływać na proces polimeryzacji mikrotubul na dwa sposoby. Może łączyć się z białkami regulacyjnymi mikrotubul: MAP-2 i STOPs i zmieniać ich powinowactwo do tubuliny [50, 55] (rys. 3) lub działać pośrednio poprzez aktywację kinazy białkowej, której substratami są m.in. białka MAP-2 i tubulina [20, 47]. Kalmodulina jako aktywator kinazy lekkich łańcuchów miozyny może także uczestniczyć w regulacji funkcji filamentów aktomiozynowych [1, 14]. Korzystając z tych obserwacji J. Whitefield [60] zaproponował następujący model działania kalmoduliny w metafazie i anafazie podczas mitozy (rys. 4):

1. W okolicy biegunów komórki dochodzi do lokalnego wzrostu stężenia jonów wapnia uwolnionych z pęcherzyków siateczki śródplazmatycznej [30].

2. Aktywowana przez jony wapnia kalmodulina wiąże się z białkami regulacyjnymi mikrotubul i aktywuje kinazę białkową zależną od  $Ca^{2+}$ , fosforylującą te białka oraz tubulinę.

3. Rozpoczyna się proces depolimeryzacji mikrotubul łączących kinetochory chromosomów z biegunami komórki. Uwolnione jednostki tubuliny zostają związane na końcach wydłużających się mikrotubul międzybiegunowych. Równocześnie kompleksy kalmodulina-wapń aktywują ATP-azę dyneinową, co prowadzi do przesuwania się względem siebie mikrotubul międzybiegunowych [43].

4. W okolicy podbłonowej dochodzi do lokalnego wzrostu stężenia jonów wapnia. Kompleksy kalmodulina-wapń aktywują kinazę lekkich łańcuchów miozyny, co zapoczątkowuje skurcz mikrofilamentów w bruzdzie podziałowej [1, 60].

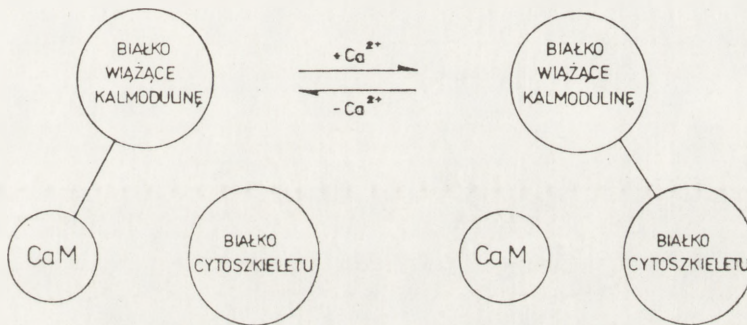
Korzystając z przedstawionego modelu można w uproszczony sposób wyjaśnić przyczyny zahamowania pod wpływem inhibitorów kalmoduliny wzrostu komórek podczas przejścia z metafazy do anafazy w mitozie. Wiadomo jednak, że proces ten jest o wiele

bardziej złożony, ponieważ wraz z kalmoduliną w regulacji funkcji wrzeciona kariokinetycznego uczestniczy wiele innych czynników m.in. cykliczne nukleotydy i aktywowane przez nie kinazy białkowe.

Mechanizm działania kalmoduliny w fazie  $G_0 \setminus G_1$  i  $G_1 \setminus S$  nie jest dotąd dokładnie poznany. Proponowane są co najmniej cztery drogi wpływu kalmoduliny na proces syntezy DNA. Są to :

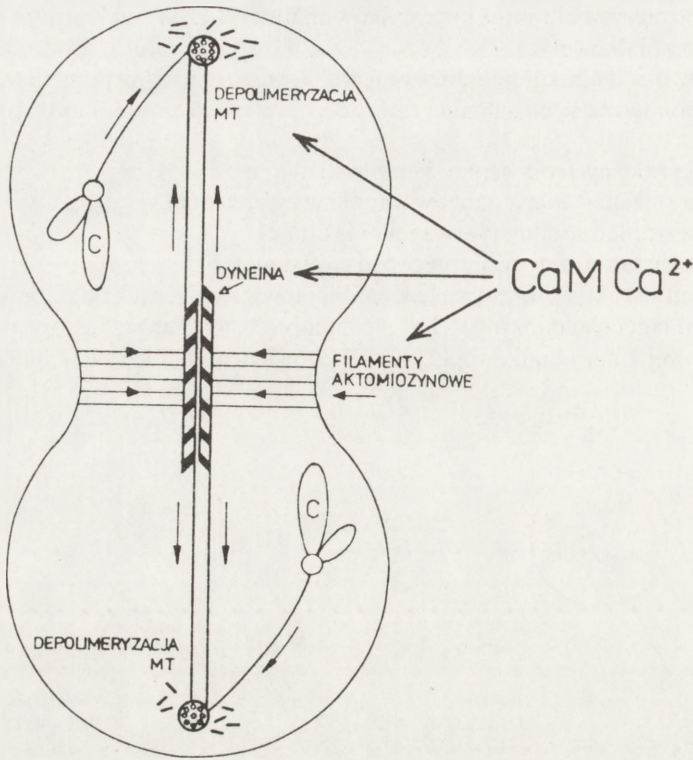
- 1° aktywacja zależnych od wapnia kinaz białkowych,
- 2° regulacja stężenia wolnych jonów wapnia w cytoplazmie,
- 3° wpływ na stopień spolimeryzowania mikrotubul,
- 4° regulacja metabolizmu cyklicznych nukleotydów.

Kalmodulina jest aktywatorem wielu kinaz białkowych zależnych od wapnia m.in. kinazy NAD, lekkiego łańcucha miozyny [1,14],  $\beta$ -tubuliny [20, 47], kinazy fosforylasy glikogenowej [14], jądrowej kinazy białkowej [2, 49, 60]. Dowiedziono także, że kalmodulina może



RYS. 3. Schemat działania kalmoduliny na białka cytoszkieletu (wg [50]), *CaM* – kalmodulina

w sposób pośredni wpływać na aktywność kinaz zależnych od cAMP i cGMP regulując poziom cyklicznych nukleotydów w komórce [61]. Jak wiadomo, fosforylacja i defosforylacja enzymów kluczowych za pośrednictwem kinaz i fosfataz białkowych jest jednym z uniwersalnych sposobów regulacji przebiegu wielu procesów metabolicznych. W czasie cyklu komórkowego również obserwuje się okresowe zmiany w fosforylacji specyficznych białek np. białek rybosomalnych [57, 60], jądrowej laminy B [7, 57], białek niehistonowych [57] i histonów  $H_1$  i  $H_3$  [57, 60], wimentyny i wielu białek o nieznannej funkcji [37, 57]. W ostatnich latach pojawiły się doniesienia o udziale kalmoduliny w procesie fosforylacji histonów  $H_1$  i  $H_3$  zapoczątkowującej kondensację chromatyny [9, 60]. Według A. Meansa i C. Rasmussena [37, 44] kalmodulina może pełnić istotną rolę w regulacji ekspresji niektórych genów cyklu komórkowego, np. genu *cdc28* u drożdży, MPF u *Xenopus laevis*, genu *c-myc* w mysich komórkach C127. Autorzy ci zauważyli, że komórki wykazujące nadprodukcję kalmoduliny mają 2–3-krotnie wyższy poziom mRNA dla produktu genu *c-myc* niż komórki grupy kontrolnej. J. Whitefield [60] w pracy poświęconej czynnikom regulacyjnym cyklu komórkowego wspomina także o udziale kalmoduliny w regulacji translacji białek. Proponowany mechanizm tej regulacji polegałby na aktywowaniu przez kalmodulinę fosfatazy zależnej od wapnia, która z kolei aktywowałaby czynnik inicjujący



RYS. 4. Uproszczony model działania kalmoduliny w anafazie podczas mitozy komórek zwierzęcych (wg [60]), wzrost stężenia jonów wapnia w okolicy biegunów komórki prowadzi do powstawania kompleksów kalmodulina-wapni, które wywołują skracanie się mikrotubul łączących kinetochory chromosomów z biegunami komórki, aktywowana w tym samym czasie ATP-aza dyneinowa powoduje rozsuwanie się względem siebie mikrotubul międzybiegunowych, lokalny wzrost stężenia jonów wapnia w okolicy podbłonowej indukuje skurcz pasa mikrofilamentów w brzdzie podziałowej, *CaM* – kalmodulina, *C* – chromosom, *MT* – mikrotubule

translację eIF-2 oraz syntetazy aminoacylo-tRNA. Kalmodulina ma ponadto zdolność uczyniania kinazy fosforylującej i aktywującej białko rybosomalne S6 [8, 41].

Jony wapnia, jak wspomniano we Wstępie, są regulatorami wielu procesów skorelowanych z aktywnością proliferacyjną komórek. Kalmodulina reguluje stężenie wolnych jonów wapnia w komórkach na dwa sposoby:

- Aktywuje ATP-azę zależną od jonów  $\text{Ca}^{2+}$  i  $\text{Mg}^{2+}$  [45, 26].
- Uczestniczy w procesie uwalniania jonów wapnia z siateczki śródplazmatycznej w odpowiedzi na czynniki mitogenne [26].

A. Boynton i Hill [26] wykazali, że inhibitory kalmoduliny hamują wpływ jonów wapnia z siateczki śródplazmatycznej w komórkach fibroblastycznych C3H i komórkach wątroby szczura poddanych uprzednio działaniu mitogenów. Ponieważ inhibitory w stosowanym przez nich zakresie stężeń nie zmieniały aktywności ATP-azy zależnej od  $\text{Ca}^{2+}$  i  $\text{Mg}^{2+}$  oraz kinaz białkowych A i C, wysunięto przypuszczenie, że kalmodulina uczestniczy w

mechanizmie sprzęgającym receptory Ins 1, 4, 5-P<sub>3</sub> z kanałami wapniowymi siateczki śródplazmatycznej. Według tej koncepcji w komórkach, w których poziom kalmoduliny jest wyższy, jak np. w komórkach transformowanych nowotworowo, podwyższona aktywność proliferacyjna mogłaby być skutkiem defektywnej mobilizacji jonów wapnia z przedziałów wewnątrzkomórkowych.

Inną z proponowanych dróg regulacji prroliferacji komórek przez kalmodulinę jest kontrola stopnia spolimeryzowania elementów cytoskieletu, a zwłaszcza mikrotubul [16, 18, 53]. Według wielu autorów sygnał depolimeryzacji mikrotubul wywołany przez wzrost stężenia CaM może zapoczątkować syntezę DNA [9, 18, 19, 53]. Badania przeprowadzone przez Crossina wykazały, że związki wywołujące depolimeryzację mikrotubul w mysich komórkach fibroblastycznych 3T3 indukują syntezę DNA w analogiczny sposób jak czynniki wzrostowe. Efektowi temu przeciwdziałano podając środki stabilizujące mikrotubule. Zgodnie z tą hipotezą, wzrost poziomu kalmoduliny w fazie G<sub>1</sub>/S wywoływałby falę depolimeryzacji mikrotubul, wzrost stężenia dimerów tubuliny, co w efekcie byłoby sygnałem do rozpoczęcia syntezy DNA. Przypuszczenie to zostało częściowo potwierdzone przez Ben-Ze'eva, który zaobserwował, że pod koniec fazy G<sub>1</sub> wzrasta w komórkach poziom dimerów tubuliny [9].

Cykliczne nukleotydy wraz z jonami wapnia stanowią grupę przekaźników II rzędu uczestniczących w transdukcji sygnałów mitogennych [4]. Ich poziom podlega skokowym zmianom w czasie cyklu komórkowego [60]. Przypuszcza się, że kalmodulina mogłaby być jednym z białek odpowiedzialnych za indukcję takich zmian. Dowiedziono, że jest ona aktywatorem dwóch enzymów o przeciwnych funkcjach: 3'5'fosfodiesterazy i cyklazy adenylanowej [14, 15, 61, 62]. Można więc oczekiwać, że drobne zmiany w aktywności kalmoduliny będą decydować o rozpoczęciu i zakończeniu procesu syntezy cAMP oraz o kinetyce rozkładu cAMP, a przez to określać skokowy charakter sygnału. Powyżej wymienione cztery koncepcje dotyczące mechanizmu regulacji wzrostu komórek prawidłowych przez kalmodulinę są obecnie najczęściej dyskutowane w literaturze.

Komórki nowotworowe wykazują zaburzenia w gospodarce wapniowej wyrażające się podwyższonym poziomem jonów wapnia oraz białek wiążących wapń, a także pojawieniem się nowych jakościowo białek tej grupy [24, 33, 36, 64]. Obecnie duże zainteresowanie budzi onkomodulina – białko znajdujące w tkankach nowotworowych oraz w mysim i ludzkim łożysku. Do tej pory zidentyfikowano ją w 85% mysich, szczurzych i ludzkich nowotworów i linii komórek transformowanych [7, 34, 35]. Jest to białko o masie cząsteczkowej 12 kDa i pI 3,9, mające, podobnie jak parwalbumina, dwa miejsca wiązania jonów wapnia w cząsteczce [34, 35]. Według MacManusa onkomodulina może być uważana za białko pokrewne kalmodulinie pod względem funkcji. Wykazano, że onkomodulina podobnie jak kalmodulina aktywuje 3'5'fosfodiesterazę oraz stymuluje proliferację komórek hodowanych w pożywkach zawierających niskie stężenie jonów wapnia [22, 34, 35]. Poznanie funkcji onkomoduliny uważanej przez niektórych autorów za białko znacznikowe komórek nowotworowych może okazać się istotne dla opracowywania nowych metod terapii nowotworów.

#### PODZIĘKOWANIE

Pragnę wyrazić wdzięczność Panu profesorowi Włodzimierzowi Korohodzie, Kierownikowi Zakładu Biologii Komórki IBM, UJ, za cenne uwagi dotyczące przygotowywanego artykułu.

## LITERATURA

- [1] ADELSTEIN RS. Calmodulin and the regulation of the actinmyosin interaction in smooth muscle and nonmuscle cells. *Cell* 1982; **30**: 349–350.
- [2] BACHS O, CARAFOLI E. Calmodulin and calmodulin-binding proteins in liver cell nuclei. *J Biol Chem* 1987; **262**: 10786–10790.
- [3] BERCHTOLD MW. Covalent conjugation of mammalian calmodulin with ubiquitin. *FEBS Lett* 1988; **237**: 103–107.
- [4] BERRIDGE M. Inositol triphosphate and diacylglycerol as second messengers. *Biochem J* 1984; **220**: 345–360.
- [5] BOYNTON AL, KLEINE LP. Mediation of calcicalmodulin and cyclic AMP of tumor promoter induces DNA synthesis in calcium-deprived rat liver cells. [w] *Ions, Cell Proliferation and Cancer*. London: Academic Press 1982: 417–433.
- [6] BOYNTON AL, WHITEFIELD JF. Calmodulin stimulates DNA synthesis in rat liver cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1980; **93**: 745–749.
- [7] BREWER LM, MacMANUS JP. Detection of oncomodulin, an oncodevelopmental protein in human placenta and choriocarcinoma cell lines. *Placenta* 1987; **8**: 351–363.
- [8] BUARKHARD SJ, TRAUGH JA. Changes in ribosome function by cAMP- dependent and cAMP-independent phosphorylation of ribosomal protein S6. *J Biol Chem* 1983; **258**: 14003–14008.
- [9] CHAFOULEAS JG, BOLTON WE, MEANS AR. Calmodulin and the cell cycle: involvement in regulation of cell cycle progression. *Cell* 1982; **28**: 41–50.
- [10] CHAFOULEAS JG. Effect of viral transformation on the intracellular regulation of calmodulin and tubulin. [w] *Ca<sup>2+</sup>-binding protein: structure and function*. Amsterdam: Elsevier 1980: 189–196.
- [11] CHAFOULEAS JG, LAGACE L, MEANS AR. Changes in calmodulin and its mRNA accompany reentry of G<sub>0</sub> cells into the cell cycle. *Cell* 1984; **36**: 73–81.
- [12] CHAFOULEAS JG, MEANS AR. Calmodulin is an important regulatory molecule in cell proliferation. [w] *Ions, Cell Proliferation and Cancer*. London: Academic Press 1982: 449–463.
- [13] CHAFOULEAS JG, PARDUE RL. Regulation of intracellular levels of calmodulin and tubulin in normal and transformed cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981; **78**: 996–1000.
- [14] CHEUNG WY. Calmodulin plays a pivotal role in cellular regulation. *Science* 1980; **207**: 19–27.
- [15] CHEUNG WY, BRADNAM LS. Protein activator of 3':5'nucleotide phosphodiesterases of bovine or rat brain also activates its adenylate cyclase. *Biochem Biophys Res Commun* 1975; **66**: 36–41.
- [16] CROSSIN KL, CARVEY DH. Evidence that microtubule depolymerization early in the cell cycle is sufficient to initiate DNA synthesis. *Cell* 1981; **23**: 61–71.
- [17] ENGSTROM W, ZETTERBERG A. Calcium phosphate and cell proliferation. [w] *Ions, Cell Proliferation and Cancer*. London: Acad. Press 1982: 341–359.
- [18] FRIEDKIN M, LEGG A, ROZENGURT E. Antitubulin agents enhance the stimulation of DNA synthesis by polypeptide growth factors in 3T3 mouse fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA* 1975; **976**: 3902–3912.
- [19] GLENNEY JR, GLENNEY JP. Erythroid spectrin, brain fodrin and intestinal brush border proteins (TW 260/240) are molecules containing a common calmodulin-binding subunit bound to a variant cell-type specific subunit. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982; **79**: 4002–4005.
- [20] GOLDENRING JR, GONZALEZ BJ. Purification and characterisation of calmodulin-dependent kinase from rat brain cytosol able to phosphorylate tubulin and microtubule-associated proteins. *J Biol Chem* 1984; **258**: 12632–12640.
- [21] GRABAREK Z, KUŹNICKI J. Homologiczne białka wiążące wapń. *Post Biochem* 1980; **26**: 209–224.
- [22] HAIT WN. Targeting calmodulin for the development of novel cancer chemotherapeutic agents. *Anti-Cancer Drug Design* 1987; **2**: 139–149.
- [23] HATASE O, ITANO T. A possible role for calmodulin in Ca<sup>2+</sup>-induced swelling of mitochondria. *Biochem Int* 1987; **15**: 793–798.
- [24] HEIZMANN CW, BERCHTOLD MW. Expression of parvalbumin and other Ca<sup>2+</sup>-binding proteins in normal and tumor cells: a topical review. *Cell Calcium* 1987; **8**: 1–41.
- [25] HEPLER PK. Calcium restriction prolongs metaphase in dividing *Tradescantia* stamen hair cells. *J Cell Biol* 1985; **100**: 1363–1368.
- [26] HILL TD, CAMPOS-GONZALES R, BOYNTON AL. Inhibition of inositol triphosphate-stimulated calcium mobilization by calmodulin antagonists in rat liver epithelial cells. *J Biol Chem* 1988; **263**: 16479–16482.



- [27] HUSAIN A, HOWLETT GJ. The interaction of calmodulin with human and avian spectrin. *Biochem Biophys Res Commun* 1984; **122**: 1194–1200.
- [28] IRVINE RF. How do inositol 1, 4, 5-triphosphate and inositol 1, 3, 4, 5-tetraphosphate regulate intracellular  $Ca^{2+}$ . *Biochem Soc Trans* 1988; 6–10.
- [29] KEITH CH. Effect of microinjected calcium – calmodulin on mitosis in PtK<sub>2</sub> cells. *Cell Motil and the Cytoskel* 1987; **7**: 1–9.
- [30] KEITH CH, RATAN R. Local cytoplasmic  $Ca^{++}$  gradients. *Nature* 1985; **316**: 848–850.
- [31] KRETSINGER RH, BARRY CD. The predicted structure of the calcium-binding component of troponin. *Biochem Biophys Acta* 1975; **405**: 40–52.
- [32] KUŹNICKI J. Stan badań nad białkami wiążącymi wapń – refleksje po międzynarodowym sympozjum w Crans Montana. *Post Biol Kom* 1987; **14**: 121–129.
- [33] KUŹNICKI J, FILIPEK A. Purification and properties of a novel  $Ca^{2+}$ -binding protein (10,5 kDa) from EAT cells. *Biochem J* 1987; **247**: 663–667.
- [34] MacMANUS JP. Calcium binding proteins and cell proliferation. [w] Jons, Cell Proliferation and Cancer. London: Academic Press 1982: 489–499.
- [35] MacMANUS JP, WATSON PC. The complete aminoacid sequence of oncomodulin – a parvalbumin-like calcium-binding protein from Morris hepatoma. *Europ J Biochem* 1983; **136**: 9–17.
- [36] MEANS AR, LAGACE L, GUERRIERO V. Calmodulin as a mediator of hormone action in cell regulation. *J Cell Biochem* 1982; **20**: 317–330.
- [37] MEANS AR, RASMUSSEN CD. Calcium, calmodulin and cell proliferation. *Cell Calcium* 1988; **9**: 313–319.
- [38] MOSATELLI D, SANUI H, RUBIN A. Effects of depletion of  $K^{+}$ ,  $Na^{+}$  or  $Ca^{2+}$  on DNA synthesis and cell cation content in chick embryo fibroblasts. *J Cell Physiol* 1979; **101**: 177–182.
- [39] PARDUE RL, BRADY RC. Production of monoclonal antibody against calmodulin by in vitro immunization of spleen cells. *J Cell Biol* 1983; **96**: 1149–1158.
- [40] PAYNE ME, FONG YL. Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II. *J Biol Chem* 1988; **263**: 7190–7195.
- [41] PEUCH CJ, BALTESTER R. Purified rat brain calcium and phospholipid dependent protein kinase phosphorylates ribosomal protein S6. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983; **80**: 6858–6868.
- [42] PINOL MR, BERCHTOLD MW. Increased calmodulin synthesis in the pre-replicative phase of rat liver regeneration. *FEBS Lett* 1988; **231**: 445–450.
- [43] PRATT MM. ATP-ases in mitotic spindles. *Int Rev Cytol* 1984; **87**: 83–105.
- [44] RASMUSSEN CD, MEANS AR. Calmodulin required for cell cycle progression during  $G_1$  phase and mitosis. *The EMBO J* 1989; **8**: 73–82.
- [45] ROBINSSON C, LARSSON C. Identification of calmodulin-stimulated  $Ca^{2+}$   $Mg^{2+}$  ATP-ase in plasma membrane fraction isolated from maize leaves. *Physiol Plant* 1988; **72**: 177–184.
- [46] RUSSEL AH, FOSTER KA. Calcium-dependent calmodulin binding proteins associated with mammalian DNA polymerases  $\alpha$ . *Biochem Biophys Acta* 1988; **951**: 315–321.
- [47] SAHYOUN N, LA VINE H. Cytoskeletal calmodulin-dependent protein kinase II. *J Biol Chem* 1985; **260**: 1230–1237.
- [48] SHUTT C. Hands on the calcium switch. *Nature* 1985; **315**: 15.
- [49] SIKORSKA M, WHITEFIELD JF, RIXON RH. The effect of thyroparathyroidectomy and 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> on changes the activities of some cytoplasmic and nuclear protein kinases during liver regeneration. *J Cell Physiology* 1983; **115**: 297–304.
- [50] SOBUE K, KANDA K. Calmodulin-binding proteins that interact with actin filaments in a  $Ca^{++}$ -dependent flip-flop manner: survey in brain and a secretory tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983; **80**: 6868–6871.
- [51] STEMPLE DL, STUART C. Dynamics of fluorescent calmodulin analog in the mammalian mitotic spindle at metaphase. *Cell Motil and the Cytoskel* 1988; **9**: 231–242.
- [52] SUDHAKAR YB, SACK SJ. Three dimensional structure of calmodulin. *Nature* 1985; **315**: 37–40.
- [53] TENG M, BARTHLOMEW JC. Synergism between anti-microtubule agents and growth stimulants in enhancement of cell cycle traverse. *Nature* 1977; **268**: 739–741.
- [54] Van ELDIK LJ, WATTERSON MD. Calmodulin and  $Ca^{++}$ -binding proteins in normal and virus transformed fibroblasts: levels, subcellular distribution and regulation. [w] Jons, Cell Proliferation and Cancer. London: Academic Press 1982: 449–465.
- [55] VANIARD M, AMBERT AM. Characterisation and immunocytochemical distribution of calmodulin in higher plant endosperm cells: localisation in the mitotic apparatus. *J Cell Biol* 1985; **101**: 488–499.
- [56] VEIGL ML, VANAMAN TC, SEDWICK DW. Calcium and calmodulin in cell growth and transformation. *Biochem Biophys Acta* 1984; **738**: 21–48.

- [57] WESTWOOD JT, CHURCH RB, WAGENAAR EB. Changes in protein phosphorylation during the cell cycle of CHO cells. *J Biol Chem* 1985; **260**: 10308–10313.
- [58] WHITEFIELD JF, PERRIS AD, YOUDALE T. The role of calcium in the mitotic stimulation of rat thymocytes by detergents, agmatine and poly-L-lysine. *Exp Cell Res* 1968; **53**: 155–165.
- [59] WHITEFIELD JF. The roles of calcium and magnesium in cell proliferation: an overview. [w] *Ions, Cell Proliferation and Cancer*. London: Acad.Press 1982: 283–285.
- [60] WHITEFIELD JF, DURKIN JP. Calcium, cyclic AMP, and protein kinase C – partners in mitogenesis. *Cancer and Metastasis Rev* 1987; **5**: 205–250.
- [61] WRIGHT MS, COOK BJ. Regulation of adenylate cyclase from *Leucophaea maderae* by calcium, calmodulin and forskolin. *Comp Biochem Physiol* 1986; **85c**: 357–362.
- [62] YUNG PL., CHEUNG W. Cyclic 3'5'nucleotide phosphodiesterase. *J Biol Chem* 1976; **251**: 4193–4198.
- [63] ZAVORTNIK M, WELSH MJ. The distribution of calmodulin in living mitotic cells. *Exp Cell Res* 1983; **149**: 375–385.
- [64] ZENDEGUI JG, ZIELIŃSKI RE. Biosynthesis of calmodulin in normal and virus transformed chicken embryo fibroblast. *Mol Cell Biol* 1984; **4**: 883–889.

Otrzymano: styczeń 1990

Przyjęto: 12 czerwca 1990

Adres autorki: ul. L. Wenedy 11/106, Kraków

# REGULACJA EKSPRESJI GENÓW EUKARYOTÓW

## GENE REGULATION IN EUKARYOTES

Antoni HORST

Zakład Genetyki Człowieka Polskiej Akademii Nauk

*Streszczenie.* Przedstawiono poglądy na regulację ekspresji genów eukaryotów. Omówiono wpływ obrotu metabolicznego mRNA na jego przeżycie, w tym rolę nie ulegających translacji fragmentów 5' i 3', części kodującej oraz poli (A). Z kolei przedstawiono rolę białek regulatorowych w ekspresji genów eukaryotów wraz z omówieniem poszczególnych motywów struktury tych białek (struktura *helix-turn-helix*, "palce cynkowe" i *leucine zipper*) warunkujących specyficzne łączenie się ich z DNA. Omówiono również najważniejsze czynniki transkrypcji biorące wraz z enzymami udział w tworzeniu kompleksu inicjacyjnego. Szczególną uwagę zwrócono na mechanizm terminacji transkrypcji, będący w porównaniu z terminacją transkrypcji prokaryotów procesem bardzo złożonym i niezupełnie jeszcze wyjaśnionym. Poza tym omówiono specyficzne mechanizmy regulacji ekspresji genów histonów, mających w swym 3' nie ulegającym translacji końcu pętlę odpowiedzialną za regulację ich ekspresji; następnie autoregulacyjny mechanizm ekspresji genów tubulin. Na szczególną uwagę zasługuje potranskrypcyjna regulacja ekspresji genu omówiona na przykładzie ekspresji genów ferrytyny i receptora transferryny, których skordynowana regulacja ekspresji genów warunkuje adekwatne dostarczanie do komórek żelaza lub jego magazynowanie w postaci ferrytyny. Wreszcie przedstawiono mechanizmy regulacji ekspresji genów receptorów hormonów sterydowych oraz regulację ekspresji poprzez interakcję białek regulatorowych.

*Summary.* Views on gene regulation of eukaryotes were discussed. Turnover of particular mRNA fragments (5' and 3' untranslated fragments, coding sequences and poli (A)) are principal elements of the life span of mRNAs. Regulatory proteins with their motifs binding specific sites of DNA (*helix-turn-helix*, *zinc-finger* and *leucine zipper*) are the next important elements of gene regulatory mechanisms, responsible for finding proper sites of activated genes. The role of transcription factors and enzymes engaged in the preinitiation complex are discussed. Special interest have been paid to the termination of transcription which contrary to prokaryotes in eukaryotes is very complex and not fully cleared up. Discussed are also specific mechanisms of histone genes regulation (with a loop of nucleotides within the 3' untranslated region responsible for their regulation), the autoregulated instability of tubulin mRNA's, the *cis-trans* models for post-transcriptional coordination of gene regulation of ferritin and transferrin receptor responsible for adequate supply of Fe into cells and gene regulatory mechanisms of steroid hormone receptors.

*Wykaz skrótów.* AP-1 i następnego tego samego szeregu – białka aktywujące transkrypcję, ATF = *activator transcription factor* – aktywuje transkrypcję z promotorem E4 adenowirusa, C/EBP – białko łączące się ze swoistym miejscem DNA (zawiera *leucine zipper*), CP<sub>1</sub>, CP<sub>2</sub> – białka łączące się z sekwencją CCAAT (C<sub>1</sub> – ludzkiej globiny  $\alpha$  i głównego późnego promotora adenowirusa, C<sub>2</sub> –  $\gamma$  fibrynogenu i promotora adenowirusa inicjującego replikację), CRE – *cAMP responsive element* DNA, CREB – białko wiążące się z CRE, CTF/NF-1 – czynnik aktywujący transkrypcję i replikację, występujący blisko N-terminalnego końca białka regulatorowego,

*NF-1* – białko jądrowe, wiążące CCAAT adenowirusa, aktywujące replikację, *NF-A1*, *NF-A2* – białka wiążące oktamerowe sekwencje promotora łańcucha ciężkiego immunoglobulin (*IgH*), *EGF* = *epidermal growth factor*, *GAL* – gen produkujący enzym rozkładający galaktozę, *GAL4* – białko wiążące się z DNA, aktywujące gen *GAL*, *GAL80* – inhibitor miejsc aktywnych *GAL4*, blokujący syntezę z genu *GAL*, *UASG* = *upstream activating sequence* DNA – miejsce wiązania *GAL4* z DNA, *GCN4* – białko drożdży wiążące DNA (zawiera *leucine zipper*), aktywator transkrypcji, *GM/CSF* – czynnik umożliwiający tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów, *HAP2/HAP3* – kompleks białek drożdży wiążący sekwencję CCAAT, *HRE* = *hormone regulatory element* DNA, *IRE* = *iron responsive element* – element DNA wiążący żelazo, *IRE-BP* = *IRE-binding protein* – białko wiążące element *IRE*, *SRE* = *sterol regulatory element* – oktamerowa sekwencja promotora wiążąca białka regulatorowe receptora hormonów sterydowych, *TRE* – *HRE* zależny od hormonów tarczycy, *hsp90* – białko szoku termicznego (90 Da), *MATα2* – białko drożdży wiążące wybiórczo gen i powodujące supresję jego transkrypcji, *OCT-1* i następne tego szeregu – białka wiążące się z oktamerami sekwencji DNA o charakterze "homeodomen", *Sp1* – białko wiążące sekwencje *GC*, zawierające "palce cynkowe" i inne regiony o powinowactwie do DNA, aktywujące polimerazę RNA II, *SRF* = *serum response factor* – białko surowicy krwi aktywujące transkrypcję, *PABP* = *poly(A)binding protein* – białko łączące się z poli(A), odpowiedzialne za stabilizację mRNA, *TF* = *transcription factor* – białko aktywujące transkrypcję, *TFIIA* do *TFIIF* – czynniki transkrypcji biorące udział w tworzeniu kompleksu inicjacyjnego z udziałem polimerazy RNA II, *TFIIIA* – czynnik transkrypcji genów 5S RNA z udziałem polimerazy RNA III, *TfR* – receptor transferyny, *TFIIS* (inna nazwa *SII*) – czynnik elongacji, wiążący polimerazę RNA II, *UPE* = *upstream promotor element* – sekwencja DNA, poprzedzająca promotor, *USF* = *upstream sequence factor* – białko wiążące sekwencję poprzedzającą *UPE* w tworzeniu kompleksu inicjacyjnego, VP16 – białko wirusa opryszczki

## WPROWADZENIE

Ekspresja genów należy do najbardziej podstawowego zagadnienia współczesnej biologii – od tego zależy bowiem funkcjonowanie każdego żywego organizmu, gdyż mimo obecności prawidłowych genów, bez ich uruchomienia w odpowiednim czasie i miejscu w organizmie, życie danego organizmu nie może toczyć się prawidłowo. Toteż wyjaśnienie regulacji ekspresji genów (ich uruchomienie oraz hamowanie w zależności od potrzeb organizmu, względnie ich stała, tzw. konstytutywna czynność) należy do najpilniejszych zadań współczesnej biologii molekularnej. Ostatnio również w tej dziedzinie wystąpił znaczny postęp, jednak jest on jeszcze zawsze niedostateczny.

Regulacja ekspresji genów prokaryotów, opierająca się przede wszystkim na mechanizmie transkrypcji, została już w znacznej mierze poznana [76]. Punktem zwrotnym w badaniach tego problemu u eukaryotów było określenie sekwencji DNA, mających istotne znaczenie w regulacji ekspresji oraz poznanie czynników wchodzących w interakcję z odpowiednimi sekwencjami DNA [5]. Do *cis* aktywnych elementów regulacji ekspresji genów eukaryotów należą elementy promotora, określające zarówno poziom aktywacji genu, jak również dokładne miejsca inicjacji transkrypcji wraz z elementami poprzedzającymi promotora oraz oddalonymi elementami wspomagającymi (*enhancer*), które mogą zarówno wspomagać działanie czynników regulacyjnych, jak i modulować ich czynność [54]. Badania biochemiczne nad tymi czynnikami doprowadziły do skonstruowania układów bezkomórkowych (*in vitro*), w których izolowane geny ulegają regulowanej transkrypcji, co pozwala na identyfikację oraz scharakteryzowanie czynników biorących udział w tych procesach. Badania na nieoczyszczonych ekstraktach komórek HeLa, zawierających elementy promotora oraz wszystkie czynniki transkrypcji, pozwoliły na wierne odtworzenie procesu transkrypcji jak w prawidłowej komórce. Jednak późniejsze badania wykazały, że dodatek czynników łączących się z oddalonymi elementami wspomagającymi

promotora oraz czynników *trans*, tj. ogólnoustrojowych [64] i tkankowo-swoistych [31, 65], powoduje przyspieszenie transkrypcji, co sugeruje, że czynniki te pobudzają transkrypcję poprzez ułatwienie czynnościowej interakcji z elementami promotora (brak tych czynników limituje wielkość transkrypcji). Następne badania wykazały, że proces powstania kompleksu preinicjacyjnego jest wieloetapowy [22].

Regulacja ekspresji genów może występować na każdym poziomie transkrypcji i translacji. Obecnie przyjmuje się, że główny mechanizm regulacji ekspresji genów eukaryotów polega, podobnie jak u prokaryotów, na regulacji transkrypcji.

Transkrypcja genów przez polimerazę RNA II obejmuje trzy główne stadia:

- 1° inicjację,
- 2° elongację,
- 3° terminację transkryptu.

Właściwy transkrybowany gen poprzedza region bogaty w pary AT, tj. TATAAA lub ATAAA (tzw. *TATA box*), występujący ok. 28 pz przed nim oraz miejsce startu, odpowiadające miejscu *CAP* mRNA. Sekwencje występujące przed miejscem startu transkrypcji, stanowiące jego bezpośredni region kontrolny, określamy jako promotor. Nie jest to jednak reguła. Istnieją bowiem promotory nie mające regionu TATA. Wreszcie występują również sekwencje regulujące z mniejszej lub większej odległości od właściwego promotora, których działanie jest niezależne od ich orientacji i pozycji w stosunku do genu, o działaniu potęgującym lub hamującym transkrypcję, określane jako czynniki potęgujące (*enhancer*). Zawierają one zazwyczaj sekwencje GC lub CCAAT. W badaniach regulacji ekspresji genów eukaryotów można wyróżnić dwa kierunki, jeden zależny od struktury DNA i w konsekwencji od struktury transkryptu, drugi zależny od czynników wykonujących czynność transkrypcji i obróbki pierwotnego transkryptu (różne enzymy i czynniki wpływające na te procesy). Regulacja transkrypcji może odbywać się na następujących poziomach:

- transkrypcji specyficznych regionów DNA przez interakcję z elementami *cis* i *trans*,
- usuwania intronów w procesie składania (*splicing*) pierwotnych transkryptów,
- modyfikacji końców 5' i 3' pierwotnych transkryptów,
- transportu mRNA do cytoplazmy,
- potranskrypcyjnej regulacji ekspresji genu,
- translacji.

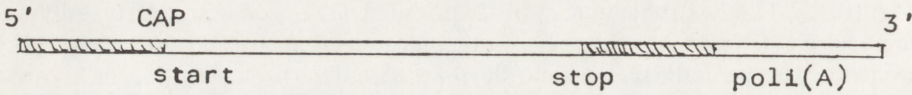
Istotne znaczenie w utrzymywaniu stałego, właściwego dla danej komórki i jej czynności poziomu mRNA ma obrót metaboliczny mRNA. W procesie tym decydującą rolę mają:

- komórkowe i pozakomórkowe sygnały pobudzające degradację mRNA;
- poszczególne fragmenty struktury mRNA;
- enzymy (rybonukleazy) oraz
- czynniki *trans* wpływające na interakcję enzymów nukleolitycznych z mRNA.

Szybkość obrotu metabolicznego mRNA wynosi od kilku minut do kilku godzin i dni. Na przykład półokres życia mRNA interferonu, *c-myc*, *c-fos*, GM-CSF wynosi zaledwie 30 minut. Z kolei poziom mRNA genów odpowiedzialnych za ciągłość procesów życiowych (*house keeping genes*) jest stały dzięki ich nieprzerwanej syntezie, zaś regulacja ich poziomu polega na regulacji wielkości ich rozpadu, w którym rolę odgrywają takie czynniki, jak: kinaza tymidynowa, reduktaza dihydrofolianowa, syntaza tymidylanowa, histony i inne. mRNA tych genów podlega dodatkowej potranskrypcyjnej kontroli. Inny rodzaj regulacji odbywa się poprzez bodźce tkankowe (np. mRNA globiny).

## REGULACJA EKSPRESJI GENU PRZEZ OBRÓT METABOLICZNY mRNA

Stabilizacja lub destabilizacja mRNA gra istotną rolę w utrzymywaniu odpowiedniego poziomu mRNA, stanowiąc tym samym ważny element regulacji ekspresji genu. Dopiero niedawno podjęto szczegółowe badania nad trwałością mRNA. Nieoczekiwanie okazało się, że proces rozkładu mRNA zależy w dużej mierze od jego struktury (rys. 1) oraz wewnątrz- i zewnątrzkomórkowych czynników pobudzających jego degradację [78, 81].



RYS. 1. Schemat mRNA: zakresowane części od końców 5' i 3' nie ulegają translacji, start i stop oznaczają początek i koniec translacji

### ROLA 5' NIEKODUJĄCEGO FRAGMENTU mRNA

Pierwsze spostrzeżenia dotyczyły badań nad komórkowym protoonkogenem c-myc, kodującym białko wpływające na prawidłową proliferację komórek. Półokres trwania mRNA c-myc wynosi ok. 10 minut. Badania przeprowadzone w nowotworowych komórkach węzłów chłonnych (komórki B) wykazały, że mRNA c-myc ma obcięty niekodujący fragment 5' przy prawidłowych odcinkach kodujących, 3' niekodujących i poli(A). Zsyntetyzowane białko było prawidłowe, a półokres trwania jego mRNA był przedłużony, będąc 3–5 razy bardziej stabilnym. Obecność stabilnego mRNA c-myc o przedłużonym działaniu mogła być przyczyną zwiększonej ilości białka pobudzającego proliferację i tym samym prowadzić do procesu nowotworowego [81]. Ponieważ oprócz niekodującego fragmentu 5' obcięciu ulegał również pierwszy kodujący ekson uważa się, że sekwencje odpowiadające za trwałość mRNA c-myc są zlokalizowane właśnie w tym eksonie [27, 73, 77].

### ROLA 3' NIEKODUJĄCEGO FRAGMENTU mRNA

Badania przeprowadzone na onkogenie fos wskazały, że sekwencje odpowiadające za trwałość jego mRNA są zlokalizowane w niekodującym fragmencie 3' mRNA. mRNA onkogeny wirusowego v-fos jest bardziej stabilny, aniżeli mRNA jego protoonkogeny c-fos. Porównanie mRNA v-fos i c-fos wykazało, że różnią się one jedynie niekodującym fragmentem 3', podczas gdy pozostałe są identyczne. Niekodujący fragment 3' mRNA c-fos przyłączony do fragmentu 5' mRNA v-fos spowodował u tego ostatniego skrócenie półtrwania do połowy, a nawet jednej trzeciej. Stąd wniosek, że 67 pz niekodujących odcinka 3' odgrywają rolę w obrębie metabolicznym mRNA [60,78], co zostało potwierdzone w przypadku delekcji niekodującego fragmentu 3', powodującej zwiększoną stabilność tego

mRNA [60,78]. Najbardziej przekonującego dowodu na rolę niekodującego fragmentu 3' mRNA dostarczyły badania Treissmana [92], który dokonał fuzji 3' sekwencji c-fos mRNA z 5' fragmentem mRNA  $\beta$  globiny, czego następstwem było skrócenie półokresu trwania mRNA  $\beta$  globiny z normalnych ok. 7 godzin do ok. 30 min, tj. normalnego okresu półtrwania mRNA c-fos. Degradacja c-fos mRNA jest prawdopodobnie uzależniona od więcej niż jednego strukturalnego elementu, ponieważ usunięcie sekwencji bogatych w AU nie wpłynęło na zwiększenie stabilności [6].

Badania sekwencji w obrębie niekodującego fragmentu 3' niestabilnych mRNA wykazały obecność jednej lub kilku sekwencji bogatych w AU: AUUUA [7] – obecność jednej sekwencji AUUUA jest prawdopodobnie niewystarczająca, gdyż sekwencja taka znajduje się również w niekodującym fragmencie 3' mRNA  $\beta$  globiny, będącym mimo tego stabilnym mRNA. Stąd sugestia, że destabilizujący efekt wymienionej sekwencji AU jest prawdopodobnie tylko czynnikiem modulującym, współdziałającym z białkiem tworzącym kompleks z poli(A) [8,78]. Badania komórek biorących udział w procesach zapalnych wykazały, że sekwencje 50–60 nukleotydów bogatych w AU w niekodującym fragmencie 3' mRNA białek ulegających specyficznej ekspresji w stanach zapalnych są związane ze stabilnością tych mRNA [11, 87].

Nowsze badania nad mRNA o krótkim okresie przeżycia wykazały, że sekwencje AUUUA tworzą bardzo stabilne kompleksy białko-RNA odporne na działanie czynników denaturujących. Przyjmuje się, że białko występujące w tych kompleksach stanowi znacznik szybkiej cytoplazmatycznej degradacji tego mRNA [53].

Wreszcie najbardziej przekonującym naturalnym dowodem roli niekodującego fragmentu 3' mRNA są badania łańcuchów  $\beta$  globiny i  $\delta$  globiny, z których  $\beta$  globina występuje w przeważającej ilości w porównaniu do małych ilości  $\delta$  globiny. Stwierdzono, że ich mRNA (region kodujący i niekodujący fragment 5') praktycznie nie różnią się, natomiast istotne różnice występują w niekodującym regionie 3'. Jednocześnie wykazano, że mRNA  $\delta$  globiny ulega około 4-krotnie szybszemu rozpadowi niż  $\beta$  globiny. Dane te sugerują, że zróżnicowany rozpad oraz ilości występowania  $\beta$  i  $\delta$  globin zależą od ich niekodujących fragmentów 3' [81].

### WPLYW FRAGMENTU POLI(A) mRNA NA TRWAŁOŚĆ mRNA

Od dawna sugerowano, że fragment ten chroni mRNA przed atakiem rybonukleaz, jednak dopiero ostatnio badania z odcinaniem tego fragmentu od znanych mRNA o długim okresie półtrwania wykazały, że zabieg ten powodował radykalne skrócenie okresu półtrwania mRNA. Dla przykładu tak skrócony mRNA wprowadzony do normalnych komórek wykazywał okres półtrwania od 4 do 8 godzin, podczas gdy niezmieniony mRNA w tych samych komórkach wykazywał półokres trwania 60 godz. [81].

Obecnie uważa się, że fragment poli(A) samodzielnie nie ochrania mRNA przed trawieniem przez rybonukleazy, lecz odbywa się to dzięki jego połączeniu ze swoistym białkiem wiążącym poli(A) *PABP* (*poly(A)-binding protein*). Białko *PABP*, wykryte niezależnie przez Blobela i Brawermana, wiąże się z poli(A) ze 100-krotnie większym powinowactwem aniżeli do jakiegokolwiek innego fragmentu mRNA [81]. Białko *PABP* nie jest jedynym białkiem tworzącym kompleks z mRNA, wiadomo bowiem, że mRNA nie występuje w postaci wolnej, lecz w postaci kompleksu z szeregiem białek jako rybonukleoproteid (mRNP), powodując jego stabilizację. Przeprowadzone badania z mRNA

pozbawionym tego białka wykazały, że traci on swoją stabilność mimo obecności poli(A), którą odzyskuje po dodaniu oczyszczonego białka *PABP*. Powstaje pytanie, dlaczego *PABP* w równym stopniu nie stabilizuje wszystkich mRNA? Ross sugeruje, że wybiórcza trwałość poszczególnych mRNA zależy prawdopodobnie od współdziałania całego kompleksu mRNA [81].

### WPLYW KODUJĄCEGO FRAGMENTU mRNA NA JEGO TRWAŁOŚĆ

Badania nad tym fragmentem mRNA przeprowadzono głównie na mRNA histonów. Insercje zmutowanych genów histonów mRNA ze skróconym lub przedłużonym fragmentem kodującym prowadzą do skutku przesunięcia sygnałów "stop" mRNA do tworzenia zmienionych polirybosomów, niezdolnych do syntezy prawidłowych cząsteczek histonów [55]. Zmutowane mRNA o zmienionym fragmencie kodującym miały co najmniej dwukrotnie dłuższy okres przeżycia, co tłumaczy się tym, że odpowiednie RN-azy szybciej "rozpoznają" prawidłowe mRNA i je degradują od końca 3' – stąd zmiana miejsca "stop" może w istotny sposób wpływać na przebieg degradacji mRNA [55].

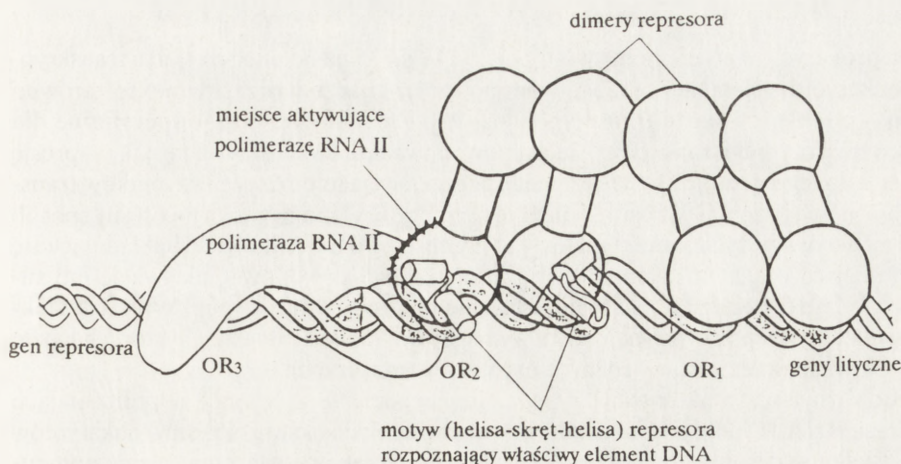
## ROLA BIAŁEK REGULATORYWYCH W EKSPRESJI GENÓW EUKARYOTÓW

Obrót metaboliczny mRNA możliwy jest jedynie dzięki działaniu całego układu enzymów i różnego rodzaju czynników białkowych ukierunkowujących działanie tych enzymów oraz modulujących ich czynność. Zagadnienia te zostały dotąd najlepiej poznane na układach prokaryotów, toteż zanim przejdę do omawiania białek regulatorowych eukaryotów, omówię najpierw mechanizmy działania białek regulatorowych ekspresji genów prokaryotów.

Do badań nad regulacją ekspresji genów nadaje się szczególnie fag lambda, badany w tym względzie od przeszło 30 lat [75]. Po wstrzyknięciu DNA wirusowego do komórki bakteryjnej lub zwierzęcej następuje: albo ekspresja wszystkich genów wirusowych, czego następstwem jest replikacja wirusa i w następstwie liza lub rozsądzenie komórki (bakteryjnej lub zwierzęcej), albo też geny wirusowe zostają zahamowane, a jego DNA zostaje wbudowany jako inertyny materiał do DNA komórkowego. W specyficznych warunkach, kiedy dojdzie do uszkodzenia aparatu genetycznego komórki (napromienianie promieniami pozafioletowymi, jonizującymi, zadziaływanie mutagenami chemicznymi itp.), inertyny DNA wirusa ulega aktywacji poprzez zniesienie represji, czego następstwem jest ekspresja genów wirusowych, powodująca replikację wirusa z następczym uszkodzeniem komórki. Aktywacja genów wirusowych występuje w tym ostatnim przypadku z powodu uszkodzenia aparatu genetycznego komórki niezdolnego do produkowania represora. Tak więc pierwszym białkiem wykrytym w procesie regulacji ekspresji genu jest represor, produkowany przez aparat genetyczny zakażonej komórki na podstawie kodu zawartego w genomie wirusa.

Podstawową jednostką białkową represora lambda jest monomer o kształcie zbliżonym do hantli, mający na obydwu końcach zwinięte w postaci kul domeny podobnej wielkości. Dwa monomery łączą się tworząc dimer zdolny do łączenia się z DNA wirusa. Schemat





RYS. 2. Schemat aktywacji (genu represora) i supresji (genów litycznych) faga lambda: (przerysowane za [76])

operatora lambda przedstawiono na rysunku 2. Jak na nim przedstawiono, dwa dimery represora łączą się z DNA operatora lambda w miejscach oznaczonych OR1 i OR2, liczących po 17 pz. Umownie na schemacie po prawej stronie operatora OR1 występują geny lityczne faga lambda, warunkujące namnażanie cząstek wirusa poprzedzone przez promotor stanowiący miejsce, do którego przyłącza się polimeraza RNA. Z kolei po prawej stronie operatora OR3 występuje gen kodujący represor lambda, poprzedzony również sekwencją promotora. Promotor genów litycznych należy do "silnych", podczas gdy promotor represora jest "słaby". Przy braku represora polimeraza RNA łączy się z promotorem genów litycznych. W przeciwieństwie do tego połączenia dwóch cząsteczek represora (w miejscu OR1 i OR2) ze względu na obecność miejsca aktywującego represora w miejscu OR2 odgrywającego w tym wypadku rolę aktywatora, następuje przyłączenie polimerazy RNA do promotora genu represora, czego następstwem jest synteza represora hamującego geny lityczne wirusa. Istnieje prawdopodobnie niewielka różnica w sekwencji wymienionych promotorów, z których jeden (w tym wypadku lewy) dzięki obecności miejsca aktywującego łączy się z polimerazą RNA, czego następstwem jest synteza represora, hamującego geny lityczne wirusa [75, 76], podczas gdy aktywacja genów litycznych dzięki "silnemu" promotorowi występuje natychmiast, jak tylko wystąpi brak represora. Promotor genów eukaryotów jest znacznie bardziej skomplikowany i rozciąga się prawdopodobnie na znaczną długość DNA obejmując szereg krótkich (10 do 20 pz) sekwencji zarówno poprzedzających, jak i następujących po miejscu startu transkrypcji, łączących się z szeregiem białek, stanowiących czynniki transkrypcji [95]. Czynniki te łączą się swoiście z elementami transkrypcji, chociaż są również dane wskazujące, że ten sam czynnik transkrypcji może łączyć się z różnymi elementami transkrypcji, jak również te same elementy transkrypcji mogą łączyć się z różnymi czynnikami transkrypcji [95], prowadząc do powstania kompleksu inicjacyjnego transkrypcji.

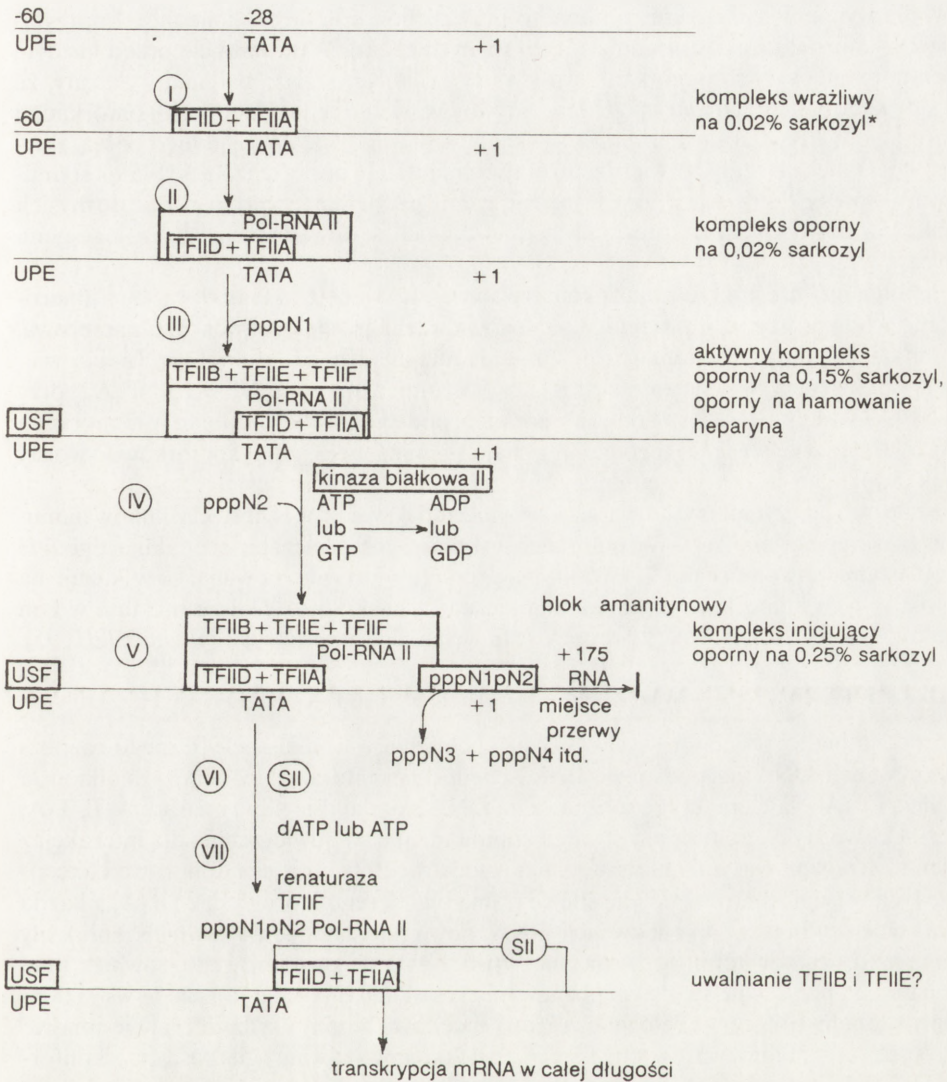
## CIS ELEMENTY WIĄŻĄCE CZYNNIKI TRANSKRYPCJI

O ile u prokaryotów *cis* elementy występują od 10 do 35 pz od miejsca startu transkrypcji, to u eukaryotów elementy te mogą występować na znacznej przestrzeni i to zarówno przed, jak i po miejscu startu transkrypcji [62, 95]. Elementy te, wiążąc specyficzne dla danej sekwencji czynniki transkrypcji, mogą powodować zarówno aktywację, jak i supresję transkrypcji danego genu [62]. *Cis* elementy poprzez wiązanie różnych czynników transkrypcji (hormony, czynniki wzrostu, działanie temperatury) mogą w zróżnicowany sposób wpływać na aktywację tych samych genów [62]. Częściowo lub całkowicie nakładające się na siebie miejsca wiązania czynników transkrypcji mogą powodować aktywację lub supresję, względnie też oddziaływać synergistycznie na proces transkrypcji. Wreszcie niektóre geny dla aktywacji transkrypcji mogą wymagać kilku miejsc inicjacji, z których każde jest kontrolowane przez zestawy różnych czynników transkrypcji [62].

Spośród różnych czynników transkrypcji najlepiej poznane są czynniki współdziałające z polimerazą RNA II (por. podrozdział: Enzymy w regulacji ekspresji genów eukaryotów str. 179). Białka te cechuje dość znaczna różnorodność, jak i pewne zamieszanie nomenklaturowe. Dotąd nie jest pewne, czy czynniki *TF* (*transcription factor*) są tylko podobne, czy wręcz identyczne z poszczególnymi czynnikami podanymi tam w nawiasach (str. 180). Symbol II oznacza współdziałanie z polimerazą RNA II, przez niektórych zresztą oznaczaną jako polimerazę RNA B. Sposób, w jaki transkrypcja jest regulowana przez promotor, zależy od sekwencji promotora i obecności odpowiednich czynników transkrypcji mogących wpływać zarówno dodatnio, jak i ujemnie na przebieg tego procesu. Swoista aktywność czynników transkrypcji zależy od ich wzajemnego powinowactwa, ponieważ końcowa reakcja tworzenia kompleksu inicjacyjnego polega właśnie na wzajemnym łączeniu się czynników transkrypcji z polimerazą RNA II [38, 49, 58, 83, 95]. Poza tym aktywność czynników transkrypcji jest kontrolowana przez szereg dodatkowych reakcji, takich jak: fosforylacja, interakcja z białkami regulatorowymi, hormonami, jonami metali itp. [62, 95]

Powstawanie kompleksu inicjacyjnego jest procesem bardzo złożonym i do końca jeszcze nie wyjaśnionym. Jednym z najlepiej poznanych w tym zakresie jest tworzenie kompleksu inicjacyjnego z późnego promotora adenowirusa 2, przedstawionego na rysunku 3 (za Saltzmanem i Weinmannem [83]). A z kolei Wasylyk [95] przedstawia tworzenie kompleksu inicjacyjnego w postaci łączenia szeregu czynników transkrypcji (tzw. *enhancer*) z odpowiadającymi im elementami transkrypcji zarówno poprzedzającymi, jak i następującymi po miejscu startu transkrypcji (to ostatnie tłumaczy występowanie *enhancer* nawet w intronach właściwego genu), przy czym właściwy kompleks inicjacyjny powstaje w wyniku interakcji odpowiednich czynników transkrypcji z polimerazą RNA II. W ten sposób właściwy kompleks inicjacyjny z polimerazą RNA II byłby pewnego rodzaju konserwatywnym kompleksem występującym w wielu reakcjach transkrypcji z różnych genów, natomiast czynniki transkrypcji rodzaju *enhancer* odpowiadałyby tkankowo swoistym czynnikiem [25, 34].

Tkankowo-swoiste czynniki transkrypcji zostały najlepiej poznane na przykładzie aktywacji genów immunoglobulin łańcucha ciężkiego *IgH* i lekkiego *Ig $\kappa$*  (kappa), których ekspresja jest ograniczona do limfoidalnej linii komórkowej B. Przeprowadzone badania wykazały, że różne komórki układu limfoidalnego mają sekwencje typu *enhancer* dla komórek B, hamowane przez odpowiednie czynniki w komórkach niespecyficznych dla



\*sarkozyl = lauroil kwasu N-metyloaminooctowego

RYS. 3. Schemat inicjacji transkrypcji z późnego promotora adenowirusa 2 (przerysowano za Saltzmanem i Weinmannem [83]), zbliżony model inicjacji transkrypcji podają Mermelstein, Flores i Reinberg [58], objaśnienia znaków: UPE, USF, TF dla białek: A,B,D,E,F, SII = TFIIS patrz Wykaz skrótów, Pol-RNA II – polimeraza RNA II

ekspresji *IgH*. Natomiast w komórkach B występują liczne czynniki wzmacniające, prowadzące do indukcji transkrypcji genów podczas różnicowania komórek pre-B. Geny immunoglobulin należą do szczególnie skomplikowanych, zawierając części zmienne V, części odpowiedzialne za różnorodność *D* (*D* – diversity), części łączące *J* (*J* – joining) oraz szereg genów stałych *C* (*C* – constant). W trakcie ekspresji genów *IgH* dochodzi do aktywacji

genów dla wymienionych części, a ponadto przy zachowaniu części zmiennej do przyłączenia (*S* – *switch*) części stałych od  $C_{\mu}$  do różnych  $C_{\gamma}$  itd. Wykazano, że przed każdym elementem genu V występuje tkankowo-swoisty *enhancer*. Dalsze badania wykazały, że centralny subfragment *enhancer IgH* jest aktywny w wielu nielimfoidalnych komórkach i dopiero jego oskrzydłujące sekwencje są tkankowo-swoiste powodując jego pełną aktywację [95]. Dane te zostały potwierdzone eksperymentalnie poprzez izolację białek stymulujących ekspresję dojrzałego (po rearanżacji) genu *IgH*. Białka te wprowadzone do mysich fibroblastów powodowały ekspresję uprzednio do nich wprowadzonego dojrzałego genu *IgH* [95].

Promotor *IgH* ma poprzedzającą konserwatywną sekwencję oktamerową, heptamerową oraz sekwencję bogatą w pirymidyny. Z tego najważniejsza jest sekwencja oktamerowa, której mutacja powoduje dramatyczne zmniejszenie aktywności promotora. Białka wiążące się z sekwencją oktamerową zostały oczyszczone, oznaczone NF-A1 i NF-A2, przy czym NF-A1 występuje we wszystkich komórkach, podczas gdy NF-A2 tylko w komórkach B [95]. W przeciwieństwie do tego gen *Ig $\kappa$*  zdaje się mieć tylko jeden komórkowo-swoisty czynnik indukujący transkrypcję [95].

Niezależnie od czynników aktywujących wykazano również obecność czynników hamujących transkrypcję genu *IgH*. W komórkach hybrydowych szpiczaka produkującego *IgH* z fibroblastami lub komórkami T, transkrypcja genu *IgH* jest zahamowana, co wskazuje na obecność w tych komórkach czynnika hamującego transkrypcję. Dalsze badania w tym kierunku pozwalają sugerować, że represory te wchodzą w interakcję z *enhancer IgH* [95].

#### CHARAKTERYSTYKA WIĄZANIA BIAŁEK REGULATORYWYCH Z DNA

Interakcja białek regulatorowych wymaga spełnienia warunku specyficznego rozpoznania sekwencji DNA na podstawie fizyko-chemicznej interakcji pomiędzy białkiem a sekwencją DNA. Na elementy rozpoznawania DNA składają się 4 pary zasad: A-T, T-A, C-G i G-C. Swoisty układ tych par stwarza komplementarną powierzchnię dla interakcji z białkiem. Głównymi wiązaniami są wiązania wodorowe, toteż miejsca donorowe i akceptorowe tych wiązań stanowią główną siłę wiązania białek regulatorowych z DNA, a każda zmiana struktury białka, jak i sekwencji DNA, powoduje zakłócenie (zmniejszenie) siły wiązania aż do całkowitej utraty wiązania. Oprócz wiązania wodorowego, również inne wiązania mogą przyczynić się do rozpoznawania sekwencji DNA, są to przede wszystkim oddziaływania hydrofobowe (głównie z grupą metylową tyminy) oraz interakcje jonowe zasadowych reszt aminokwasowych. Niemalą rolę odgrywa również giętkość oraz konformacja DNA [4].

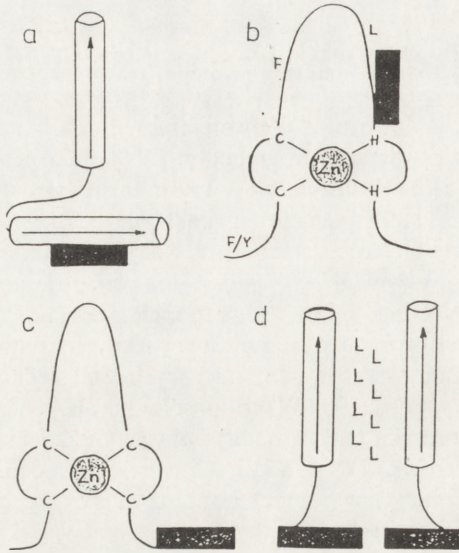
Szczególną rolę w regulacji ekspresji genu przez białka odgrywa zajęcie specyficznych miejsc DNA. Na to ma wpływ nie tylko powinowactwo właściwego miejsca wiązania, ale również liczba cząsteczek wolnego białka regulatorowego oraz powinowactwo do alternatywnych miejsc współzawodniczących o dane białko regulatorowe [4]. Niezależnie mogą też występować rzekome miejsca wiązania (*pseudosites*), których liczba zależy prawdopodobnie od wielkości DNA (im większa cząsteczka DNA, tym większa może być liczba sekwencji przypadkowo zgodnych z sekwencją właściwą dla danego genu [4]).

## SWOISTE STRUKTURY (MOTYWY) BIAŁEK REGULATORYWYCH EUKARYOTÓW

Ostatnio wykryto szczegółowe ukształtowania fragmentów białek regulatorowych umożliwiających wiązanie z odpowiednimi fragmentami DNA. Jako pierwszą wykryto strukturę zwaną helisa-skręt-helisa (*helix-turn-helix*) w krystalicznej strukturze aktywatorowych i supresorowych białek regulatorowych szeregu bakterii [45, 75, 90]. Struktura ta składa się z dwóch helis  $\alpha$ , przedzielonych strukturą  $\beta$ , z których jedna jest helisą rozpoznającą, znajdującą się w rowku większym DNA, o swoistej sekwencji aminokwasów umożliwiającej swoiste interakcje z DNA, natomiast druga z nich przyjmuje pozycje poprzeczną w stosunku do tej pierwszej tworząc szereg niespecyficznych kontaktów z DNA (rys. 4a). Mimo znacznej różnicy aminokwasów uczestniczących w tej strukturze, uderzającą jest jej stała (konserwatywna) geometria [90]. W ten sposób interakcja białka regulatorowego (na przykładzie wiązania represora faga lambda) odbywa się dzięki wystającym helisom  $\alpha$ , pasującym do większego rowka DNA, a których całość pasuje jak gwint do śruby dzięki swoistej geometrii helis leżących w poprzek i wzdłuż większego rowka DNA.

U eukaryotów, białka mające strukturę helisa-skręt-helisa, wykryto najpierw u drozofili we wczesnym okresie rozwoju. Białka te mają wysoce konserwatywną "homeodomenę", złożoną z ok. 60 reszt aminokwasowych, z sekwencjami podobnymi do tych, jakie występują w prokaryotycznych białkach zawierających struktury helisa-skręt-helisa [90]. Struktury te wykazano w ponad 80 różnych białkach eukaryotów (od drożdży począwszy, na człowieku skończywszy). Do najlepiej poznanych białek tego typu należy białko drożdży pod nazwą MAT $\alpha$ 2, które wiążąc się z operatorem określonego genu, powoduje supresję jego transkrypcji. Niezwykle duże  $\alpha$ 2 operatory mają na obydwu końcach wysoce konserwatywne sekwencje. Odpowiednio do tego  $\alpha$ 2 dimery białka regulatorowego wchodzi w wybiórczą interakcję z DNA z obydwoma końcami operatora (bez łączenia się z częścią centralną operatora). Białko MAT $\alpha$ 2 ma, podobnie jak białko prokaryotów, dwie domeny, C-terminalną wchodzącą w interakcję z DNA operatora i N-terminalną nie wchodzącą w interakcję z DNA, lecz ułatwiającą dimeryzację tego białka [90].

Białko TFIIIA (czynnik transkrypcji IIIA) niezbędne do prawidłowej inicjacji transkrypcji genów 5S RNA u *Xenopus* przez polimerazę RNA III, o m. cz. 40 kDa, wchodzi w interakcję z regionem 50 pz w obrębie genu 5S RNA (wewnętrzny region kontrolny genu 5S RNA). Białko to występuje w dużych ilościach w jajnikach jako kompleks 7S z 5S RNA, łącząc się zarówno z DNA, jak i RNA [72]. Następnie wykazano, że pod wpływem czynników chelatujących (DTT, EDTA) białko to traci stabilność, co wskazuje, że jakiś metal brał udział w wiązaniu z DNA i RNA [61]. Wreszcie wykazano, że białko to zawiera duże ilości reszt histydynowych i cysteinowych oraz cynk niezbędny dla transkrypcji genów 5S RNA [45, 72]. Dalsza analiza (za pomocą przedłużonej proteolizy) wykazała, że białko to zawiera periodycznie uporządkowane małe domeny, o m. cz. 3 kDa z jednym atomem cynku [45]. W całości białko to zawiera 7–11 atomów cynku w 9 powtarzających się podjednostkach z ok. 30 resztami aminokwasowymi – w całości białko to składa się z 344 reszt aminokwasowych [45, 90]. Pary histydyny i cysteiny występują w czterościennej koordynacji z atomem cynku, zaś reszty aminokwasowe pomiędzy wiązaniami koordynacyjnymi występują w postaci "palców" (*finger*) [90] (rys. 4b). Struktury "palca cynkowego" lub podobne występują w wielkiej liczbie białek wiążących DNA z pewną lub prawdopo-



RYS. 4. Charakterystyczne fragmenty (motywy) białek wiążących DNA: a – helisa-skręt-helisa, b – "cynkowy palec" C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>, c – "cynkowy palec" C<sub>4</sub>, d – *leucine zipper* (przerysowane za K. Struhlem [90])

dobną obecnością atomów cynku [45]. Część tych białek odgrywa rolę aktywującą transkrypcję, inne zaś biorą udział w procesach rozwojowych lub determinacji płci [90].

Istnieje również odmiana "palca cynkowego", w której zamiast reszt histydynowych i cysteinowych występują 4 reszty cysteinowe (rys. 4c). Ten rodzaj białek wykryto w czynniku transkrypcyjnym GAL4 oraz w receptorach steroidowych dla estrogenu, progesteronu, glukokortykoidów oraz receptorów hormonów tarczycowych ssaków [45, 90].

Jak z powyższego wynika, istnieją zasadniczo dwa rodzaje "palców cynkowych". Jedne biorą udział w transkrypcji przez polimerazę RNA II, występując również w TFIIA – podobnym "palcu cynkowym" obecnym w czynniku transkrypcyjnym Sp1 i innych białkach regulatorowych u wyższych i niższych eukaryotów [62]. Czynniki transkrypcyjne Sp1 ssaków, łączący się selektywnie z *cis* elementami GC zawiera trzy tandemowe "palce cynkowe" u swego końca COOH [62]. Drugi rodzaj "palców cynkowych" reprezentują białka wiążące receptory hormonów steroidowych. W tych ostatnich występują zazwyczaj "palce cynkowe" złożone z 2 par cystein w przeciwieństwie do reszt cystein-histydyn typowych dla Sp1 [62]. Rola cynku w aktywacji genu jest najlepiej zbadana w przypadku receptora glukokortykoidu szczura, gdzie wykazano, że utrata reszt cystein powoduje utratę czynności [62].

Nie rozwiązany do końca jest problem, w jaki sposób "palce cynkowe" wiążą się z DNA. Rola "palców cynkowych" w powiązaniu z DNA wydaje się być czysto strukturalna. Pod tym względem mają one wyższość nad wiązaniem dwusiarczkowym w utrzymywaniu dwóch części białka, ponieważ nie ulegają redukcji w redukującej atmosferze komórki. Charakterystyczną cechą cynku w porównaniu z Fe lub Cu jest niemożność wytworzenia potencjału redoks, który mógłby prowadzić do powstawania wolnych rodników uszkadzających DNA lub RNA, a nawet białka [45]. Ogólnie przyjmuje się, że poszczególne "palce cynkowe" nie wchodzi w bezpośrednią reakcję z DNA, lecz tworzą charakterystyczną konfigurację, która może łączyć się z czynnościowo ważnym regionem DNA. Badania genu

5S RNA DN-azą I lub II wykazały regularną periodyczność struktury DNA, oznaczoną w niekodującym łańcuchu krótkich odcinków występowania 5 lub 6 guanin (G). Okazało się, że w miejscu wiązania czynnika transkrypcji Sp1 promotora wirusa SV40, transkrybowanego przez polimerazę RNA II, występuje krótka sekwencja 5 pz guaniny, co może wskazywać również w tym przypadku na obecność "palców cynkowych" [45]. "Palec cynkowy" Cys-Cys ... Cys-Cys łączy się prawdopodobnie tylko z DNA, natomiast Cys-Cys...His-His może wiązać zarówno DNA, jak i RNA [45].

Białka "palców cynkowych" cechuje wielka różnorodność wiązania różnych sekwencji DNA. Mimo obecności konserwatywnych reszt aminokwasowych nadających właściwą strukturę "palcem cynkowym" w przypadkach swoistych sekwencji DNA dla wiązania receptorów nieznacznie różniących się struktur estrogenów i progesteronu, wiązania z DNA były zależne od niekonserwatywnych reszt aminokwasowych. Dane te dowodzą, że w wiązaniu specyficznych receptorów rola "palców cynkowych" nie jest jedyna [62].

Ostatnio wykryto nową klasę białek zawierających w swej strukturze motywy wiązania z DNA, tzw. *leucine zipper* – struktury przypominające zamek błyskawiczny, w którym rolę zachodzących na siebie ząbków występujących w przeciwnych helisach spełniają reszty leucyny [90, 94]. Motyw ten zidentyfikowano najpierw w aktywatorze transkrypcji dla miejsca GCN4 drożdży, następnie w białkach produktach onkogenów jun, fos i myc oraz innych. *Leucine zipper* składa się z 4 lub 5 reszt leucyny, oddzielonych resztami innych aminokwasów, występującymi na co drugim skręcie  $\alpha$  helisy. Zakłada się, że reszty leucyny łączą po dwie helisy  $\alpha$  poprzez zachodzenie na siebie, tworząc w rezultacie strukturę dimerową (rys. 4d). Na tej samej zasadzie GCN4 i jun wiążą się jako dimery ze swymi miejscami docelowymi (*target sites*), a fos i jun mogą tworzyć heterodimery z DNA. *Leucine zipper* tworzy dimer pomiędzy dwoma  $\alpha$  helisami z wyłączeniem DNA, nie będąc bezpośrednio zaangażowanym w interakcji z DNA. W interakcji z DNA [1, 47] wchodzi prawdopodobnie sekwencje poza właściwym dimerem.

Struktury *leucine zipper* występują również w białkach zawierających inne, wyżej omówione motywy, jak "palec cynkowy" lub "homeodomeny" w procesie rozwojowym – stąd sugestia, że być może *leucine zipper* występują głównie jako czynniki dimeryzujące różne białka, wiążące się z odpowiednimi domenami z DNA dla aktywacji genów.

Białka mające typowe motywy łączenia się z DNA opisano również w innych organelach komórkowych. Na przykład w białkach L7/L12 rybosomów występuje struktura helisa-skręt-helisa analogiczna do tej, jaka występuje w białku regulatorowym wiążącym się z DNA. Białko o tym motywie spełnia prawdopodobnie rolę czynnika wiążącego RNA z rybosomem [80].

Dimeryzacja podjednostek białek, jak wykazano na przykładach C/EBP i GCN4, jest bardzo trwała i występuje głównie w przypadku palindromicznych sekwencji [1]. Struktury *leucine zipper* występują szczególnie w włóknistych strukturach (kreatyny, lamininy i miozyny). Zasadowe domeny *leucine zipper* GCN4, Fos, Jun i C/EBP stanowią nową klasę białek wiążących się z DNA, a zastąpienie (mutacja) reszt leucyny przez inne hydrofobowe aminokwasy powoduje zanik dimeryzacji oraz wiązania się z DNA [1, 46, 70, 86].

Na szczególną uwagę zasługuje tworzenie heterodimerów, w których jeden z jego elementów, np. zasadowy region: Fos, Jun lub GCN4, rozpoznaje to samo miejsce DNA, natomiast drugi z jego elementów, np. C/EBP, rozpoznaje całkowicie inne miejsce [1]. Pozostaje do wyjaśnienia, jaki to ma wpływ na aktywację transkrypcji? Przykładem nowej czynności heterodimeru może być heterodimer Myc/MycD będący aktywatorem trans-

krypcji fibroblastów powodując ich konwersję do myoblastów, a w dalszej konsekwencji do aktywacji mięśniowo-swoistych genów [1]. Tym samym heterodimery mogą stanowić kombinowane modele regulacji ekspresji genów [1]. Inny rodzaj współdziałania występuje w przypadku tworzenia homodimerów – takim klasycznym przykładem jest homodimer Jun/Fos stanowiący stymulator transkrypcji genów reagujących na białko Ap-1 [14, 68]. Wreszcie należy też zaznaczyć, że struktury *leucine-zipper* występują nie tylko w białkach łączących się z DNA i aktywujących transkrypcję, ale również w innych białkach, zwłaszcza w regionach sąsiadujących z ich transmembranalnymi regionami, w tym w białkach kanałów potasowych  $K^+$  [57] oraz białkach silnie zwiniętych.

Następne ugrupowanie w białkach łączące się z DNA stanowi tzw. homeodomena obejmująca ok. 60 reszt aminokwasowych [62]. Homeodomeny zostały wykryte w segmentach embrionalnych muszki owocowej *Drosophila* jako regulatory aktywacji embriogenezy, następnie w komórkach kręgowców. Region homeodomeny jest spokrewniony z ugrupowaniem helisa-skręt-helisa, zawierającym głównie zasadowe i hydrofobowe reszty aminokwasów, łączące się z ugrupowaniami DNA bogatymi w pary zasad A-T i wpływające na aktywację transkrypcji. U eukaryotów ugrupowania te wiążą się z oktamerami OCT-1, OCT-2 i podobnymi występującymi głównie w szeregu komórek limfoidalnych. Wykazano je również w genie histonu H2B [62].

Trzecią grupę domen białek wiążących się z DNA stanowią białka C/EBP i podobne, wykazujące w swej strukturze obecność *leucine-zipper*. Białka te są odpowiedzialne głównie za dimeryzację białek regulatorowych, między innymi C/EBP, Jun, Fos i innych, stabilizowanych hydrofobowymi interakcjami pomiędzy przylegającymi do siebie, alfa-helikalnymi regionami dwóch podjednostek, zawierających reszty leucynowe [62]. W przypadku regionu bogatego w reszty leucynowe białka Myc, regiony te powodują tetrameryzację i następującą transformację pierwotnych komórek [62].

Czynnik transkrypcyjno-replikacyjny CTF/FN-1 stanowi zgrupowanie zasadowych aminokwasów silnie wiążących się z DNA, bez obecności "palców cynkowych", homeodomeny i *leucine zipper*. Poza tym znane są domeny białek wiążących DNA, nie mających żadnego z wyżej opisanych ugrupowań – do nich należą AP-2 i SRF (*serum response factor*). Stąd przyjmuje się, że liczba znanych ugrupowań białek wiążących się z DNA daleka jest jeszcze od całkowitej [62].

## CHARAKTERYSTYKA DOMEN BIAŁEK AKTYWUJĄCYCH TRANSKRYPCJĘ

Na wstępie należy podkreślić, że domeny aktywujące transkrypcję są całkowicie odzielone od domen wiążących DNA. Zagadnienia te zostały najpierw poznane na przykładzie białka regulatorowego GAL4 u prokaryotów, aktywującego gen GAL. Toteż najpierw omówię, jak przedstawia się sprawa aktywacji genu, na tym przykładzie. Białko regulatorowe GAL4, aktywujące geny GAL (rozkładające galaktozę), wykryto u drożdży. GAL4 jest dimerem składającym się z jednej większej i drugiej mniejszej domeny. GAL4 łączy się w odległości 250 pz przed genem GAL czterema swoistymi fragmentami z DNA w miejscu określonym UASG (*upstream activating sequence*). Miejsce to będące typowym *enhancer* ma 4 miejsca wiązania GAL4, każde po 17 pz. Wykazano, że przemieszczenie miejsca wiązania GAL4 750 pz przed genem GAL nie wpływa w istotny sposób na zmniejszenie jego aktywności. Zjawisko to tłumaczy się tym, że pomiędzy miejscem



UASG a miejscem startu transkrypcji może utworzyć się pętla, dzięki której następuje przybliżenie miejsca wiązania GAL4 z DNA do miejsca startu transkrypcji [75, 76].

Mutanty białka GAL4 przyczyniły się do poznania jego funkcjonalnej struktury. Okazało się, że mutant GAL4 pozbawiony większej domeny wiąże się z DNA, ale nie aktywuje genu, natomiast pozbawiony mniejszej domeny nie łączy się z DNA. Z kolei domena większa GAL4 zhybrydyzowana z domeną mniejszą pochodzenia bakteryjnego (spokrewnioną z białkiem represorowym) normalnie aktywuje gen GAL. Podobnie domena wiążąca DNA (miejsce UASG) zhybrydyzowana z komórką drożdżową również aktywuje gen GAL. Dane te dowodzą, że obydwie domeny większa i mniejsza białka GAL4 występują oddzielnie i są gatunkowo nieswoiste [75, 76].

Wielkość transkrypcji aktywowanej przez GAL4 zależy od obecności obydwu aktywujących regionów w obrębie większej domeny: brak obydwu regionów aktywujących powoduje brak syntezy, obecność tylko jednego regionu, obojętne którego z nich, powoduje bardzo znaczne zmniejszenie syntezy (ok. 20%). Obecność obydwu regionów aktywujących przy braku ok. 80% pozostałej części białka GAL4 powoduje zmniejszenie syntezy do około połowy i wreszcie zastąpienie obydwu aktywujących regionów domeny większej krótkim łańcuchem aminokwasowym z 15 reszt aminokwasowych przyłączonych do części wiążącej DNA powoduje bardzo znaczne zmniejszenie syntezy (do ok. 20%), podobnie jak brak jednego z regionów aktywujących [75, 76]. Miejscami aktywującymi transkrypcję (u drożdży) są krótkie kwaśne regiony białka o minimalnej homologii sekwencji aminokwasów. Kwaśne regiony GCN4 i GAL4 mimo różnic w sekwencji aminokwasów jednakowo stymulują proces transkrypcji. Sugeruje się, że kwaśne regiony aktywujące transkrypcję przedstawiają się jako krótkie amfipatyczne struktury wchodzące w interakcję z innymi białkami uczestniczącymi w procesie transkrypcji [90]. Nowsze badania wykazały, że dla aktywacji represora wystarcza jedna reszta kwasu glutaminowego [10], przy czym glutaminy są bardziej aktywne niż asparaginy.

Istotne znaczenie regionów aktywujących domeny większej GAL4 wyjaśniono za pomocą zsyntetyzowanego krótkiego łańcucha kwaśnych aminokwasów (złożonego głównie z reszt kwasu glutaminowego). Aminokwasy te tworzyły helisę z ujemnymi łańcuchami na jej powierzchni. W ten sposób zsyntetyzowany łańcuch połączony z miejscem wiązania GAL4 z DNA powodował aktywację genu. Łańcuch zsyntetyzowany z tych samych aminokwasów, ale tak że w utworzonej helisie ujemne ładunki były całkowicie bezładne, po połączeniu z częścią wiążącą DNA nie powodował aktywacji genu [75, 76].

Najbardziej przekonującym dowodem funkcji krótkich kwasowych odcinków było włączenie ich do różnych białek tworzących kompleks inicjacyjny. Sugeruje się, że kwaśne regiony białek regulatorowych stanowią ogólny mechanizm aktywacji transkrypcji również w komórkach eukaryotycznych – przykładem tego jest kwaśny region białka GAL4 aktywujący transkrypcję z różnych promotorów komórek ssaków [43, 96]. Również aktywacja transkrypcji w komórkach drożdży, obok białka onkogenu *jun* lub receptora glukokortykoidu przez kwaśny fragment tych białek, wymaga jednocześnie obecności fragmentu wiążącego DNA [85, 89]. Dane te zdają się wskazywać, że kwaśny fragment białek regulatorowych stanowi stały element transkrypcyjny ułatwiający wchodzenie w interakcję z białkiem łączącym się z sekwencją TATA i polimerazą RNA II [62]. W ten sposób białko regulatorowe spełnia dwie istotne funkcje: łącząc się ze specyficznym miejscem DNA powoduje zróżnicowaną ekspresję właściwego genu, a jednocześnie poprzez swoją właś-

ciwość łączenia się komponentami tworzącymi kompleks inicjacyjny uaktywnia transkrypcję tego genu [90].

Białko GAL4 aktywuje gen syntezy enzymu rozkładającego galaktozę jedynie w obecności galaktozy w środowisku komórkowym. W nieobecności galaktozy inhibitor GAL80 blokuje miejsca aktywne GAL4, hamując tym samym syntezę enzymu rozkładającego galaktozę. Z kolei pojawienie się galaktozy w środowisku komórkowym znosi blok GAL4 przez GAL80, umożliwiając syntezę enzymu degradującego galaktozę [75, 76].

Ciekawych wyników dostarczyły badania z insercją do inhibitora GAL80 sekwencji kwasowej GAL4 – okazało się, że tak zmieniony inhibitor staje się aktywatorem genu GAL, pod warunkiem że inhibitor GAL80 z wszczepionym regionem kwasowym GAL4 jest połączony z jego domeną mniejszą, wchodzącą w interakcję z UASG [51].

Zmiana miejsca wiązania GAL4 z drożdży w stosunku do TATA *box* nie powoduje zahamowania aktywacji transkrypcji, jednak im bliżej TATA *box* (w ramach 34 pz) następuje łączenie GAL4, tym wydajniejsza jest transkrypcja [82].

Delecyjna analiza czynnika transkrypcyjnego Sp1 wykazała obecność czterech niezależnych regionów aktywacji transkrypcji, wszystkie poza regionami "palców cynkowych", wiążących DNA. Dwie z tych domen najsilniej aktywujące transkrypcję wykazywały obecność ok. 25% glutaminy i tylko nieznaczną ilość naładowanych reszt aminokwasowych. Trzecia domena, leżąca blisko "palca cynkowego", ok. 30 reszt aminokwasowych, zawierała reszty dodatnio naładowane i wreszcie ostatnią, czwartą stanowiło ok. 30 reszt aminokwasowych od końca COOH [62]. Tak więc do kwasowej domeny aktywującej transkrypcję doszła nowa, glutaminowa. Rychło też obecność tej domeny wykazano w szeregu białek aktywujących transkrypcję (OCT-1, OCT-2, AP-2, Jun) i w licznych zaburzeń embrionalnych u drozofili, (takich jak *antennapedia*, *ultrabithorax* itp.) [62].

Trzeci rodzaj domeny aktywującej transkrypcję wykryto w czynniku CTF/NF-I. W tym wypadku był to region bogaty w prolinę (20–30%) zlokalizowany w okolicy C-terminalnej tego białka. Obecność tej domeny wykazano w licznych białkach aktywujących transkrypcję, takich jak AP-2, Jun, OCT-2, SRF [62].

Dawniejsze teorie aktywacji genu dużą rolę przypisywały zmianom konformacji DNA w miejscu łączenia się czynnika TATA *box* z sekwencją TATA. Obecnie pogląd ten ulega zachwianiu i ogólnie przyjmuje się, że ten motyw dostępności genów do polimerazy RNA odgrywa mniejszą rolę [33].

Stale jeszcze znaczną rolę w aktywacji transkrypcji zdaje się odgrywać metylacja DNA. Większość tkankowo-swoistych genów jest metylowanych, dzięki czemu stają się one nieaktywne, gdyż metylacja powoduje lokalną konfigurację chromatyny uniemożliwiającą dostęp odpowiednich enzymów i czynników transkrypcji [13]. Sądzi się, że metylacja stanowi ogólny niespecyficzny mechanizm hamowania genów, przy czym reguła ta zdaje się nie dotyczyć genów "domowych" (*housekeeping*), ulegających konstytutywnej ekspresji niezależnie od ich metylacji [13]. Przypuszcza się, że aktywacja metylowanych tkankowo-swoistych genów odbywa się w ten sposób, że najpierw następuje ich "rozpoznawanie", po czym następuje proces demetylacji, który trwa dopóty, dopóki istnieje tkankowe zapotrzebowanie na produkt tych genów. Innymi słowy demetylowane geny tkankowo-swoiste są stale dostępne dla procesu transkrypcji [23].

Na podstawie badań aktywacji genów sugeruje się, że wszystkie trzy aktywujące domeny (tj. kwasowa, bogata w glutaminę lub prolinę) stanowią domeny działające dopiero poprzez kontakt z innymi białkami. Takim białkiem może być czynnik TFIID wiążący TATA *box*.

Sugeruje się, że interakcja tych czynników może odbywać się poprzez C-terminalne regiony treoniny lub seryny z największą podjednostką polimerazy RNA II. Okolica ta bogata w niespecyficzne siły wiążące może powodować przyłączenie polimerazy RNA II i dopiero fosforylacja grup hydroksylowych może ją uwalniać, pozwalając na inicjację transkrypcji i elongację [62].

Mechanizmy aktywacji genów cechuje dość duża różnorodność. I tak pojedynczy region aktywujący może aktywować różne geny, każdy o ściśle określonej sekwencji DNA. Również aktywacja pojedynczego genu może odbywać się w ten sposób, że białko aktywujące ma kilka regionów łączących się z pojedynczymi elementami promotora powodując zmianę konformacji umożliwiającej dostęp polimerazy RNA II i w następstwie transkrypcję [75, 76].

Szczególne znaczenie w regulacji ekspresji genów eukaryotów, jeśli uwzględnimy udział w tym procesie wielu elementów DNA, ma kooperacyjne wiązanie poszczególnych elementów regulacji [75, 76]. Przeprowadzone badania regulacji ekspresji genów GAL1 i GAL10 drożdży, ulegających po tysiącokrotne zwiększeniu syntezy tych enzymów w obecności galaktozy w pożywce, wykazały, że indukcja ich aktywacji wymaga obecności krótkiej poprzedzającej sekwencji DNA (określonej jako UASG = *upstream activating sequence*, G – dla enzymu rozkładającego galaktozę) oraz białka aktywatorowego (GAL 4). Białko GAL4 wiąże się *in vivo* i *in vitro* z 4 specyficznymi miejscami UASG. Wykazano, że miejsce czwarte UAS nie może spełniać samodzielnie zadania aktywatorowego, mimo że spełnia ono ważną rolę w UASG. Wiązanie dwóch miejsc GAL4 o słabym powinowactwie do UASG wykazuje prawdopodobnie efekt synergistyczny, podczas gdy wiązanie dwóch pozostałych miejsc o silnym powinowactwie do UASG efekt addytywny [30]. Powyższe badania wskazują, że synergistyczne efekty wiązania GAL4 dowodzą jedynie kooperacji, gdyż aktywność genów GAL jest w zasadzie proporcjonalna do liczby związanych cząsteczek GAL4 [30].

Znaczenie białka wiążącego pentanukleotyd CCAAT, który stanowi sekwencję DNA zazwyczaj znacznie poprzedzającą miejsce startu transkrypcji genów eukaryotów (należącą do typu *enhancer*) w ludzkich komórkach, nie jest jednakowe. Badania przeprowadzone na komórkach HeLa, wykazały obecność trzech różnych białek: CP1 – o dużym powinowactwie do wiązania się z sekwencją CCAAT promotora ludzkiej globiny  $\alpha$  oraz głównego późnego promotora adenowirusa, CP2 – o dużym powinowactwie do szczurzego promotora łańcucha fibrynogeny oraz białka jądrowego NF-1, wiążącego się z tą samą sekwencją CCAAT adenowirusa, niezbędnego do inicjacji jego replikacji [15]. Białka składające się z różnych podjednostek mają każde własne miejsce wiązania z DNA. W przypadku CP1 dwie różne podjednostki tworzą stabilny kompleks przy braku miejsca wiązania z DNA, a co więcej obydwie te podjednostki występują w kompleksie CP1-DNA [15]. Dalsze badania wykazały, że CP1 ma te same właściwości, co białka drożdży tworzące kompleks HAP2/HAP3 i mogą działać naprzemiennie z CP1, zaś hybrydy tych białek złożone z komórek ludzkich i drożdży zatrzymują zdolność rozpoznawania elementów CCAAT [16].

Działanie aktywatorów transkrypcji najlepiej scharakteryzował Ptashne [75] w sposób następujący:

- Aktywujące regiony oraz miejsca wiązania białek regulatorowych z DNA mogą być łatwo zastąpione (wymienione) przez inne białka.

- O ile miejsca wiązania z DNA białek regulatorowych są ściśle określone i umożliwiają wybranie odpowiedniego miejsca DNA, czyli odpowiedniego genu, o tyle regiony aktywu-

jące są mało specyficzne, odznaczają się przewagą reszt kwasowych o ładunku ujemnym i specyficzną strukturą alfa helisy.

- Białka regulatorowe wydają się być uniwersalne, czego dowodem jest to, że białka regulatorowe drożdży mogą spełniać funkcje regulatorowe u tak różnych gatunków, jak ssaki, owady, a nawet rośliny, o ile tylko mają odpowiednie miejsce wiążące DNA (i odwrotnie).

- Każdy z dotąd poznanych aktywatorów może działać kooperacyjnie zwiększając stymulację odpowiedniego genu z odpowiednim miejscem wiązania DNA.

- Sile działania aktywatorów odpowiadają zazwyczaj większe odcinki wiązania z DNA.

- Aktywatory o silnym działaniu znajdują się zazwyczaj pod kontrolą odpowiednich represorów, których odblokowanie odbywa się głównie przez sprzężenie zwrotne wraz z zapotrzebowaniem odpowiednich tkanek na produkt danych genów.

Regiony DNA ulegające transkrypcji charakteryzują się często brakiem nukleosomów, wrażliwością na dezoksyrybonukleazy oraz obecnością białek niehistonowych związanych z DNA. Przeprowadzone badania wskazują, że utworzenie i stabilizacja kompleksu inicjacyjnego z sekwencyjnie specyficznymi czynnikami transkrypcji może w sposób kompetycyjny usuwać histony oraz hamować tworzenie nukleosomów. Istnieją również dowody, że przebieg tworzenia kompleksu inicjacyjnego może w pewnym stopniu zależeć również od białek zrębu jądra komórkowego (*nuclear matrix*) [62].

## RODZINY CZYNNIKÓW TRANSKRYPCJI

W miarę poznawania coraz większej liczby czynników transkrypcji okazało się, że wiele z nich ma wspólne cechy, co oznacza, że należą one do rodzin wiążących się z takimi samymi sekwencjami DNA. Tak na przykład białka należące do rodziny AP-1, wydzielone z oczyszczonych ekstraktów jądrowych przy użyciu chromatografii powinowactwa do sekwencji TGACTCA, obejmują grupę białek kodowanych przez *c-jun*, *junB*, *junD*, *fos* i *fra-1* [62]. Białko *c-jun* okazało się nawet identyczne z białkiem *p39*, wykrytym uprzednio w ekstraktach komórkowych z *Fos*, a *c-Jun* i *Fos* syntetyzowane razem *in vitro* tworzą heterodimery wiążące AP-1 [62]. Najlepsze wyobrażenia o cechach poszczególnych czynników transkrypcji daje zestawienie zamieszczone w tabeli 1.

Pozostaje jednak szereg nierozwiązanych problemów [54, 75]. Przyjmując, że białka aktywatorowe wchodzi w interakcję z innymi białkami zaangażowanymi w procesie transkrypcji – powstaje pytanie, z jakimi białkami, a mianowicie czy z polimerazą RNA II, czy też z innymi białkami o pośredniej funkcji. Istnieją pewne dane, że jest to białko uniwersalne, występujące u różnych, może nawet u wszystkich ssaków. Nierozwiązany jest również problem swoistości wymienionej interakcji. Zazwyczaj w interakcję wchodzi białka o specyficznych strukturach, podczas gdy w tym wypadku rolę aktywującą spełniają różne białka, byle tylko miały na swej powierzchni ładunek ujemny lub region bogaty w glutaminę lub prolinę. Liczba przebadanych pod tym względem białek jest jeszcze zbyt mała dla wysunięcia ogólnych wniosków.

TABELA 1. Czynniki transkrypcji (tabela opracowana na podstawie PJ Mitchell i R Tjian [62])

Czynnik	Sekwencja DNA	Cechy czynnika
GR	GGTACAN <sub>3</sub> TGTTCT	receptor hormonu glukokortykoidu, należącego do rodziny sterydowej (hormonów sterydowych, tarczycy i kwasu retynowego); wolny receptor jest związany z białkiem hsp90 w cytoplazmie; domena wiążąca DNA ma "palec cynkowy"; m. cz. 87, 5 kDa
SP1	GGGCGG	m. cz. 80 kDa; O-glikozylowany; wyznacza prawdopodobnie start translacji, ma kilka domen aktywujących, najsilniejszą o dużej zawartości glutaminy, 3 "palece cynkowe" typu C <sub>2</sub> H <sub>2</sub>
CTF/NF-I	GCCAAT	m. cz. ≥ 55 kDa; zróżnicowane <i>splicing</i> CTF z alternatywnymi domenami aktywującymi transkrypcję, bogatymi w prolinę; domena wiążąca DNA wystarcza dla replikacji
c-Jun	TGAC/GTCA	członek rodziny białek wiążących białko AP-1; c-Jun może tworzyć heterodimery wiążąc się poprzez <i>leucine-zipper</i> z białkiem Fos lub innymi białkami rodziny AP-1; m. cz. 36 kDa
C/EBP	TGTGGAAAG	pierwsze opisane białka zawierające <i>leucine-zipper</i> dla dimeryzacji, wiążące DNA
AP-2	CCCCAGGC	in vitro: hamowanie wiązania i aktywności transkrypcyjnej przez T antygen SV40, indukuje cAMP; m. cz. 48 kDa
CREB	TGACGTCA	miejsce wiązania indukuje cAMP; fosforylacja powoduje dimeryzację, wiązanie DNA, aktywność transkrypcyjną in vitro; region zawierający zasadowe <i>leucine-zipper</i> jest w 61% identyczny z domeną wiążącą c-Jun; m. cz. 35 kDa
OCT-1	ATTTGCAT	powszechne w komórkach ssaków; niektóre swoistości wiązania in vitro jak OCT-2 na oktamerowe sekwencje histonu H2B i promotory genu <i>Igκ</i> ; m. cz. 76 kDa
OCT-2	ATTTGCAT	występuje głównie w limfocytach T i B, aktywuje geny <i>Ig</i> poprzez wiązanie oktamerowe, ma <i>leucine-zipper</i> ; m. cz. 51 kDa
SRF	GATGTCCATATTAGGACATC	wiąże SRE, pośredniczące w reakcji surowicy, EGF i insuliny; dimeryzacja bez <i>leucine-zipper</i> lub homeodomeny; m. cz. 51,6 kDa

## ENZYMY W REGULACJI EKSPRESJI GENÓW EUKARYOTÓW

Podstawowym enzymem jest polimeraza RNA II. Wpływ na ten proces ma szereg dalszych enzymów, głównie egzo- i endonukleaz, a więc przede wszystkim enzymy degradujące mRNA oraz czynniki modulujące ich specyfikę i kinetykę. Aktualnie brak jest konkretnych danych o naturze tych czynników: czy istnieje specyficzna nukleaza degradująca mRNA oraz o naturze czynników modulujących ich czynność. Wiadomo np., że degradacja reowirusowego mRNA pozbawionego "CAP" odbywa się przez odpowiednią egzonukleazę od końca 5' w kierunku 3', natomiast in vitro degradacja mRNA odbywa się od końca 3' w kierunku 5'.

Pierwszym ogniwem regulacji ekspresji genów jest promotor składający się z szeregu mniej lub więcej wyraźnie określonych sekwencji DNA rozciągających się na znacznej długości DNA zarówno poprzedzających, jak i następujących po miejscu startu transkrypcji [4, 9]. Przyjmuje się, że sekwencje -40 do +30 stanowią miejsca interakcji z czynnikami transkrypcji, decydującymi o prawidłowym i skutecznym starcie transkrypcji przez polimerazę RNA II [95]. TATA *box* nie jest obligatoryjnym elementem promotora, szczególnie genów warunkujących przeżycie (tzw. *house-keeping genes*) oraz niektórych wirusów.

Na elementy poprzedzające transkrypcję składają się właściwe elementy transkrypcji, stanowiące krótkie sekwencje (10–20), wchodzące w interakcję z czynnikami transkrypcji, będącymi przeważnie białkami. Na ogół czynniki transkrypcji wchodzą w interakcję okreś-

loną sekwencją. Znane są jednak przypadki, gdzie jeden i ten sam czynnik wiąże się z całkowicie różnymi sekwencjami DNA albo różne czynniki łączą się z tym samym lub zbliżonym fragmentem DNA.

Ważną rolę modulacyjną, oprócz swoistości promotora, odgrywają czynniki transkrypcji A, B, D, E, F i SII (*transcription factors* TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIE, TFIIF i SII). Wyżej wymienione stanowią prawdopodobnie tylko część znanych lub domniemanych czynników transkrypcji. Poniżej podaję charakterystykę najważniejszych czynników transkrypcji (w nawiasach przypuszczalne czynniki o podobnej strukturze i działaniu [83]).

*TFIIA* – m. cz. 82 kDa (AB – 25,6–35 kDa, STF – 43 kDa), wszystkie one wiążą się we wczesnym okresie aktywacji transkrypcji z preinicjacyjnym kompleksem (STF zawiera ponadto aktywę).

*TFIIB* – 28 kDa (CB1, BTF3 – 27 kDa,  $\alpha$  – 35 kDa) – wiążą się z późniejszym okresem tworzenia kompleksu preinicjacyjnego (*TBFIIB* tworzy kompleks z *TFIIE* i F; BTF3 wchodzi w interakcję z polimerazą RNA II).

*TFIID* – 120–140 kDa (DB, BTFI) wiążąc się z regionem TATA box, stanowi najwcześniejszy okres tworzenia się preinicjacyjnego kompleksu.

Dalsze badania wykazały, że *TFIID* stanowi niejako "tarczę", do której dołączają się dalsze czynniki stymulujące tworzenie się preinicjacyjnego kompleksu. Takim typowym czynnikiem jest *ATF* (*activator transcription factor*) wiążący się z licznymi elementami promotora i *enhancer*, aktywujący transkrypcję z promotorem E4 adenowirusa. Wykazano kooperację pomiędzy *TFIID* a *ATF*, co z kolei ułatwia rozpoznanie promotora przez polimerazę RNA II przy współdziałaniu czynników transkrypcji *TFIIB* i *TFIIE*. Różnica polega jednak na tym, że *TFIID* wraz z *TFIIB* i *TFIIE* są stale w interakcji z polimerazą RNA II, podczas gdy *ATF* ulega dysocjacji z chwilą utworzenia gotowego kompleksu preinicjacyjnego, stanowiąc jedynie przejściowy czynnik aktywujący transkrypcję [35, 39].

*TFIIE* – 60 kDa (*CBII*, *BTFII*) wiąże się w późniejszym okresie tworzenia się kompleksu preinicjacyjnego z polimerazą RNA II.

*TFIIF* – 90 kDa (*RAP 30* – 30 kDa i *RAP 74* – 74 kDa;  $\beta\gamma$  – 250 kDa, *BTF3* – 27 kDa) – odgrywa rolę w przejściu inicjacji w elongację, wiąże się w późniejszym okresie tworzenia kompleksu preinicjacyjnego, następnie wiąże polimerazę RNA II i stymuluje elongację transkrypcji.

*SII* – 38 kDa (*RAP 38* – 38 kDa) wpływa na elongację transkrypcji oraz na przejście transkrypcji przez przerwę inicjacyjną, wiąże się z polimerazą RNA II.

Sposób łączenia się polimerazy RNA II z kompleksem inicjacyjnym nie jest też jeszcze ostatecznie rozstrzygnięty. Przypuszcza się dwa podstawowe mechanizmy: polimeraza RNA II łączy się z UAS (*upstream activation site*), co umożliwi interakcję z czynnikiem TATA box, albo też najpierw następuje interakcja UAS z czynnikiem TATA box, po czym ten kompleks łączy się z polimerazą RNA II [33]. W pierwszym przypadku pod wpływem interakcji UAS z polimerazą RNA II następowałaby zmiana konformacji polimerazy RNA II umożliwiająca interakcję z czynnikiem TATA box, natomiast w drugim zmiana konformacji czynnika TATA box umożliwiłaby interakcję z polimerazą RNA II.

Wymienione czynniki transkrypcji tworzą z polimerazą RNA II kompleks preinicjacyjny wraz z mRNA. Kompleks ten musi być utworzony przed dodaniem heparyny, będącej inhibitorem inicjacji transkrypcji, natomiast z chwilą jego utworzenia dodatek heparyny już nie powoduje zahamowania transkrypcji. Nie oznacza to jednak, że inicjacja transkrypcji może wystąpić tylko w obecności wszystkich wymienionych jej czynników, ani też,

że heparyna może łączyć się również z innymi nieznanymi czynnikami [83]. Schemat inicjacji transkrypcji przedstawiono na rysunku 3.

Tworzenie kompleksu preinicjacyjnego nie wymaga ATP, jednak do samej inicjacji jest potrzebna jego obecność. Przeprowadzone badania wykazały, że aktywnie transkrybująca eukaryotyczna polimeraza RNA II jest wysoce ufosforylowana w swojej powtarzającej się domenie końca C-terminalnego (Tyr-Ser-Pro-Thr-Ser-Pro-Ser), nieobecnej w innych zarówno eukaryotycznych, jak i prokaryotycznych polimerazach RNA [17]. Czynność kinazy powodującej fosforylację polimerazy RNA, jak i innych czynników biorących udział w procesie transkrypcji, obserwuje się również w procesie regulacji ekspresji genu.

Ważną rolę w procesie tworzenia preinicjacyjnego kompleksu zdają się odgrywać również białka wiążące się (*USF* = *upstream sequence factor*) z sekwencją poprzedzającą *UPE* (*upstream promotor element*) (por. rys. 3) lub *GAL4*. Wykazano, że obydwie te białka wchodzi w interakcję z *TFIID*. Ponadto białka wiążące *UPE* mogą wchodzić w interakcję z polimerazą RNA II [83].

#### ELONGACJA TRANSKRYPCJI

Z chwilą rozpoczęcia transkrypcji, pod wpływem szeregu strukturalnych zmian powodujących zmianę stabilności i wrażliwości kompleksu inicjacyjnego, następuje elongacja transkrypcji [83]. W miarę tworzenia kolejnych wiązań fosfodiesterowych kompleks inicjacyjny staje się coraz bardziej stabilny i silnie związany z mRNA [83]. Do czynników regulujących elongację transkrypcji należą *SII* (zwany także *TFIIS*) oraz topoizomeraza. Czynniki elongacji *SII* jest białkiem o m. cz. 38 kDa, wyodrębnionym z komórek nowotworowych płynu otrzewnej myszy lub grasicy cielęcej, umożliwiający przekraczanie przerw matrycowego RNA [83]. *SII* wchodzi w bezpośrednią interakcję z największą podjednostką polimerazy RNA II. Ponieważ gen *SII* występuje w pojedynczej kopii na haploidalny genom, czynnik ten może w sposób różnicowy wpływać na transkrypcję lub dojrzewanie (*processing*) mRNA [37]. Aktywność topoizomeraza jest w procesie elongacji dla umożliwienia rotacyjnego przebiegu polimerazy RNA II wzdłuż DNA. Elongacja następuje prawdopodobnie dzięki dodatniemu superzwinięciu (*supercoiling*) poprzedzającemu polimerazę i ujemnemu superzwinięciu poza nią [83]. In vivo zarówno inicjacja, jak i elongacja transkrypcji musi odbywać się w obecności nukleosomów, które jak się wydaje nie stanowią przeszkody w odbywaniu się tych procesów.

#### TERMINACJA TRANSKRYPCJI

Terminacja transkrypcji eukaryotów przedstawia stosunkowo mało poznany problem i dopiero nowsze badania wykazały, że proces ten może być sterowany przez odpowiednie sekwencje i tzw. przerywniki transkrypcji. Przypuszczalnie niektóre stadia procesu dojrzewania mRNA, dodanie struktury cap (7MeGppp) do końca 5', wycinanie intronów oraz wystąpienie endonukleolitycznego procesu w miejscu 3' z dodaniem poli(A) odbywa się już podczas transkrypcji [74]. U prokaryotów terminacja transkrypcji jest bardzo prosta, gdyż następuje po dojściu polimerazy do miejsca odpowiedniej sekwencji terminującej [74].

Proudfoot [74] rozważa trzy możliwości terminacji transkrypcji:

1° Terminacja może wystąpić poza normalnym 3' końcem poli(A), do czego niezbędny jest proces przekształcania końca 3'.

2° snRNA i mRNA histonów mają odrębny mechanizm terminacji transkrypcji.

3° Terminacja może wystąpić w obrębie genu, zwykle stosunkowo wcześniej po inicjacji transkrypcji.

Trudność określenia terminacji transkrypcji polega przede wszystkim na krótkim żywocie pierwotnego transkryptu, który już podczas transkrypcji ulega przemianom (dojrzwaniu). Stąd jedyną możliwością przedstawia tzw. *nuclear run-off* lub *run on procedure* (obydwa określenia oznaczają ten sam proces). Technika tego badania obejmuje oczyszczony preparat jąder komórkowych, aktywnie transkrybujący endogenny lub transfekowany obcy gen w środowisku zawierającym radioaktywne rybonukleotydowe prekursorsy [74]. Po krótkiej inkubacji, radioaktywne prekursorsy ulegają wbudowaniu do powstającego (*nascent*) transkryptu. Po krótkiej inkubacji, pozwalającej na włączenie ok. 100 nukleotydów do powstającego transkryptu, przerywa się proces inkubacji i następnie po oczyszczeniu jądrowego RNA, ten ostatni hybryduje się z fragmentami DNA (w szczególności z końcami 3'). W tej technice fragmenty DNA w obrębie pierwotnego transkryptu dają znaczące sygnały, podczas gdy fragmenty spoza pierwotnego transkryptu dają tylko sygnały wielkości tła. Znaczna liczba genów została tą techniką przebadana, wykazując silne sygnały terminacji występujące znacznie poza końcem 3' mRNA. Na przykład dla ludzkiej i mysiej  $\alpha$  globiny region odpowiedzialny za terminację występuje 100–300 pz poza poli(A), dla mysiej  $\beta$  globiny 600–1800 pz poza poli(A), dla  $\beta$  globiny króliczej 1000–1700 pz poza poli(A), dla mysiej  $\alpha$  amylazy 2000–4000 pz poza poli(A), dla owalbuminy kurczęcia 800–1000 pz poza poli(A). Tak wielki zakres występujący w przypadku genu  $\alpha$  amylazy króliczej lub genów  $\beta$  globin wskazuje na przypadkowe miejsce występowania sygnału terminacji transkrypcji [74].

Dopiero badania sekwencji różnych genów, zwłaszcza w przypadku zmiany terminacji lub ekspresji, wykazały, jaki rodzaj sekwencji powoduje prawidłową terminację. W przypadku mutantu  $\alpha$  2 globiny u chorego z  $\alpha$  talasemią pojedynczą zmiana sygnału poli(A) z AATAAA na AATAAG nie tylko wpływała na zahamowanie dołączenia poli(A), lecz również zwiększała poziom transkrypcji poza regionem 3' genu, w którym normalnie następuje przyłączenie poli(A) [74]. W ten sposób wykazano, że istnieje związek pomiędzy przyłączeniem poli(A) a terminacją transkrypcji. Podobnie przedstawia się sprawa z genem  $\beta$  globiny, gdzie terminacja transkrypcji występuje w regionie oddalonym o przeszło 1000 pz. Z kolei region ten samodzielnie nie powoduje terminacji, o czym przekonano się przenosząc go do genu E1A adenowirusa. Terminacja transkrypcji występuje w tym wypadku dopiero wtenczas, kiedy przeniesiono jednocześnie region poli(A) i region odpowiedzialny za terminację transkrypcji. Również w tym przypadku zmiana sekwencji AATAAA wstrzymuje proces terminacji transkrypcji [74]. Badania te zostały potwierdzone na wirusach, gdzie okazało się, że dla prawidłowej terminacji transkrypcji potrzebne są dwie oddzielne sekwencje (AATAAA i region bogaty w GT bezpośrednio po miejscu rozerwania łańcucha, w którym powinien być przyłączony poli(A)). Stąd każda mutacja jednego lub drugiego regionu powodowała zaburzenia terminacji z jednoczesną akumulacją jądrowego RNA [74]. Stąd wniosek, że dla terminacji transkrypcji niezbędny jest sygnał poli(A).

W związku z powyższym wysunięto szereg koncepcji co do mechanizmu terminacji transkrypcji. Jeden z tych modeli zakłada, że polimeraza RNA II zawiera w sobie swoisty czynnik elongacji, który umożliwiłaby przebieg transkrypcji wzdłuż genu aż do napotkania sygnału poli(A), czego następstwem jest uwolnienie jej od matrycy RNA. W braku tego czynnika lub jego zahamowania, terminacja transkrypcji może występować poza właści-



wym końcem danego genu. Z kolei w alternatywnym modelu, zdaniem Proudfoota bardziej atrakcyjnym, zakłada się bardziej bezpośredni udział dojrzewania końca 3' w procesie terminacji transkrypcji; skoro tylko polimeraza RNA II przekroczy miejsce poli(A), sam proces przyłączenia poli(A) może spowodować uwalnianie powstającego transkryptu od matrycy RNA, czyli od mRNA [74]. W tym przypadku polimeraza RNA II może kontynuować transkrypcję, jednak nowo powstały koniec 5' nie osłonięty strukturą cap, ulega degradacji od 5' do 3' przez odpowiednie egzonukleazy [74]. Opierając się na podobieństwie działania czynnika  $\rho$  (rho) prokaryotów sugeruje się, że również u eukaryotów całkowite rozwinięcie matrycy DNA jest głównym czynnikiem powodującym odłączenie polimerazy RNA II od matrycy z jednoczesną degradacją rosnącego transkryptu [2, 74].

Jednym z czynników mogących wpływać na heterogenność terminacji transkrypcji może być słaby sygnał dla poli(A), następnie oskrzydające sekwencje regionu 3' i wreszcie jakiś czynnik białkowy, który wiążąc się z matrycą DNA w miejscu CAAT blokuje bezpośrednio przesunięcie polimerazy RNA II odpowiedzialnej za elongację transkryptu, czego następstwem jest terminacja transkrypcji. Obecność takiego białka wykazano analizując terminację transkrypcji głównego białka fazy późnej adenowirusa, białka SV40 poli(A). Jego transkrypcja rozpoczyna się blisko miejsca CAAT głównego późnego promotora, które, jak wykazano, wiąże bliżej nieznanego swoistego czynnika białkowego. Delecja sekwencji bliskich CAAT powoduje przejście transkrypcji poza ten region. Dane te dowodzą, że terminacja transkrypcji wymaga obecności funkcjonalnego miejsca poli(A) oraz miejsca CAAT wiążącego wymienione swoiste białko. W innym przypadku wykazano, że dla efektywnej terminacji transkrypcji niezbędne są: wydajne miejsce poli(A) oraz silne miejsce przerwy w oskrzydłającej 3' części genu. W części genu oskrzydłającej koniec 3' stwierdzono obecność licznych przerw, z których każda może być miejscem terminacji transkrypcji [74].

#### MECHANIZMY TERMINACJI TRANSKRYPCJI GENÓW snRNA I HISTONÓW

Geny snRNA i histonów ulegają transkrypcji przez polimerazę RNA II jednak nie posiadają one intronów ani też sekwencji poli(A). Stąd mechanizmy ich transkrypcji muszą być różne. W przypadku snRNA wykazano, że bezpośrednio poza sekwencją końcowej pętli o kształcie spinki do włosów występuje sekwencja zgodna we wszystkich snRNA. Delecja tej sekwencji powoduje przedłużenie transkrypcji poza koniec 3'. Za pomocą analizy *nuclear run-off* wykazano, że w przypadku U1 snRNA terminacja występuje dokładnie w miejscu 3', przy czym nie wyklucza się obecności swoistego czynnika białkowego, sprzężonego z polimerazą RNA II w jego promotorze. Czynnikiem ten, napotykać wymieniając, zgodną we wszystkich snRNA sekwencję, powoduje zatrzymanie transkrypcji [74]. W przypadku histonów utworzenie końca 3' odbywa się drogą endonukleolityczną w miejscu 3' przedłużonego prekursora RNA z jednoczesnym pośrednictwem kompleksu białkowego U7 snRNA [74]. Pary zasad U7 RNA z ich sygnałem dla rozszczepienia CAAGAAAGA zostały wykazane we wszystkich końcach 3' mRNA histonów. Analiza *nuclear run-off* wykazała, że dla prawidłowej terminacji transkrypcji 3' histonów niezbędny jest udział trzech oddzielnych sekwencji, z tego jedna w obrębie regionu kodującego oraz dwie dalsze w oskrzydłającym fragmencie końca 3' [74].

## TERMINACJA TRANSKRYPCJI W OBRĘBIE GENU

W policistronicznych genach prokaryotów, dzięki zróżnicowanej terminacji transkrypcji, możliwe jest zróżnicowane wykorzystanie tego samego kodu genetycznego. Geny eukaryotów, będąc w zasadzie monocistroniczne, mogą produkować różne białka na zasadzie alternatywnego wycinania (*splicing*) intronów, jak również poprzez wielorakie miejsca poli(A). Przykładów terminacji w obrębie genów opisano dotąd kilka. Do najbardziej przekonujących należy transkrypcja genów części stałych łańcuchów ciężkich mysich immunoglobulin  $\mu$  i  $\delta$ . Terminacja transkrypcji pomiędzy eksonami  $\mu$  i  $\delta$  w niektórych wczesnych stadiach rozwojowych komórek B powoduje brak syntezy łańcuchów  $\delta$ , natomiast w późniejszym stadium rozwojowym komórek B, kiedy brak jest terminacji transkrypcji pomiędzy  $\mu$  i  $\delta$ , obydwa łańcuchy są transkrybowane.

W wielu genach transkrypcja przez polimerazę RNA II kończy się tuż po starcie, dzięki czemu powstają krótkie 5' terminalne łańcuchy RNA bez określonej funkcji. Znaczenie tego zjawiska jest niejasne, jak i mechanizmu jego powstania. Sugeruje się możliwość zbyt wielkiej liczby promotorów z wysokim poziomem polimerazy RNA II, czego następstwem może być względny niedobór czynników elongacji i stąd skrócone transkrypty tych genów. Inny mechanizm może polegać na niesprawnym mechanizmie osłaniającym koniec 5' (czyli tzw. *cap*), czego następstwem jest powstawanie nadmiernych ilości nieosłoniętych transkryptów, ulegających rozpadowi. Wreszcie sprawa może mieć charakter regulacyjny. Wykazano bowiem, że w przypadku genów hsp 70 (genów szoku cieplnego) zjawisko "krótkich" RNA z chwilą zaistnienia szoku cieplnego natychmiast zanika – stąd sugeruje się, że mechanizm ten może ułatwiać natychmiastową pełną transkrypcję z chwilą zaistnienia takiej potrzeby [74].

## REGULACJA EKSPRESJI GENÓW HISTONÓW

Stężenie mRNA histonów w ciągu jednego cyklu komórkowego zmienia się 30–50-krotnie, ulegając zmianom równoległe do zmian syntezy DNA. Zmiany te wymagają specyficznych mechanizmów kontrolnych i jak wykazały badania, odbywa się to głównie poprzez mechanizm potranskrypcyjny.

Geny histonów różnią się od pozostałych genów eukaryotów:

- brakiem intronów,
- brakiem na końcu 3' mRNA poli(A) i obecnością na końcu 3' 6 zasad, z których 4 tworzą pętlę,
- występowaniem genów histonów w skupieniu (*cluster*).

Jest znamienne, że geny pozostałych histonów w skupieniu, nie sprzężone z syntezą DNA nie mają tych właściwości [55]. mRNA genów histonów mają na swym końcu 5' strukturę osłaniającą (*cap*), po czym krótki odcinek nie ulegający translacji (40–75 nukleotydów), zaś na końcu 3' wymienioną strukturę złożoną z 6 nukleotydów, z których 4 tworzą typową dla nich pętlę, odgrywającą decydującą rolę w ich potranskrypcyjnej regulacji stężenia [55]. O poziomie mRNA histonów, podobnie jak pozostałych mRNA, decydują: wielkość transkrypcji i szybkość rozpadu. Występowanie genów histonów w skupieniu nie wpływa na regulację transkrypcji, gdyż transfekowany do komórek L myszy pojedynczy gen

H4 wykazywał nadal właściwą regulację ekspresji [55]. Szybkość rozpadu mRNA histonów zależy od ich struktury, obecności nukleaz oraz sygnałów regulujących aktywność nukleaz.

W degradacji mRNA histonów decydującą rolę odgrywa struktura końca 3' w postaci pętli. Zastąpienie sekwencji poli(A) mRNA globiny 30 nukleotydami mRNA histonów na jego końcu 3' zrównuje stabilność tak zmienionego mRNA globiny ze stabilnością mRNA histonów [55]. Sugeruje się też obecność specyficznych nukleaz – dotąd jednak nie udowodnionych. Najważniejsza w regulowanej reakcji degradacji mRNA histonów jest sprawa sygnałów indukujących proces degradacji. Dość prawdopodobny wydaje się mechanizm autoregulacyjny, polegający na nadmiarze niezwiązanych z DNA oktamerów histonów (H2A, H2B, H3 i H4) w jądrze lub cytoplazmie, prowadzący do aktywacji enzymów degradujących mRNA histonów. W ten sposób zwiększona synteza DNA wiąże wymienione oktamery histonów, powodując jednocześnie stabilizację mRNA histonów; natomiast zatrzymanie syntezy DNA, powoduje zwiększoną pulę niezwiązanych oktamerów, indukując degradację tego mRNA [55].

## AUTOREGULACYJNA NIESTABILNOŚĆ mRNA TUBULINY

Autoregulacyjny charakter mRNA nie ogranicza się do mRNA histonów, lecz obejmuje również szereg innych, jak mRNA limfokin, cytokin i protoonkogenów, w których sekwencje odpowiedzialne za niestabilność mRNA są zlokalizowane w krótkim (ok. 100 zasad) fragmencie nie ulegającym translacji na końcu 3'. Do tej grupy dochodzi ostatnio mRNA  $\alpha$  i  $\beta$  tubulin [18]. Alfa i beta tubuliny tworzą struktury komórkowe znane jako mikrotubule, których główne zadanie w mitozie polega na umożliwieniu segregacji chromosomów poprzez przyciąganie ich do biegunów dzielącej się komórki.

Najpierw wykazano, że kolchicina powoduje całkowity rozpad mikrotubul, ze zwiększeniem stężenia niezasocjowanych podjednostek tubulin. W następstwie tego stwierdzono 5–10-krotne zmniejszenie syntezy  $\alpha$  i  $\beta$  tubulin. Z kolei pod wpływem winblastyny, powodującej nie tylko rozpad mikrotubul, ale jednocześnie precypitację tubulin, następowało znaczne zwiększenie syntezy tubulin [18]. Już w tych badaniach wykazano, że zmianom syntezy towarzyszyło odpowiednio zwiększenie lub zmniejszenie stężenia mRNA tubulin. Szereg dalszych eksperymentów wykazywał, że mechanizm autoregulacyjny tubulin nie zależy od procesów odbywających się w jądrze komórkowym, lecz od zmian stabilności cytoplazmatycznego mRNA [18]. Następnie wykazano, że procesom autoregulacyjnym podlegają jedynie mRNA tubulin związanych z polisomami. Badania przeprowadzone z inhibitorem translacji – cykloheksimidem, powodującym blok elongacji i tym samym zatrzymanie mRNA tubulin w składzie polisomów – wykazały zwiększoną niestabilność tych mRNA [71]. Te badania doprowadziły do wniosku, że jedynie mRNA tubulin związane z polisomami ulegał destabilizacji, natomiast wolny nie. Z kolei badania z wprowadzeniem kodonów powodujących przedwczesną terminację translacji kończącej się przed 42. kodonem zapobiegało autoregulacji [71]. Badania te doprowadziły do wniosku, że na to, aby mRNA tubulin ulegał autoregulacji, muszą być one związane z rybosomami, a ich translacja musi przekroczyć 41. kodon od końca 3' [97].

Wreszcie dalsze badania doprowadziły do wykrycia końca 3' będącego *in statu nascendi* mRNA  $\beta$  tubuliny o składzie: Met-Arg-Glu-Ile [18], odpowiedzialnego za mechanizm

autoregulacyjny. W ten sposób został opisany nowy mechanizm autoregulacyjny oparty na określonej sekwencji mRNA, związany ponadto z rybosomem i rozpoznawany już in statu nascendi [18]. Podobną sekwencję wykazano również na końcu 3' mRNA  $\alpha$  tubuliny.

## POTRANSKRYPCYJNA CIS-TRANS REGULACJA EKSPRESJI GENU

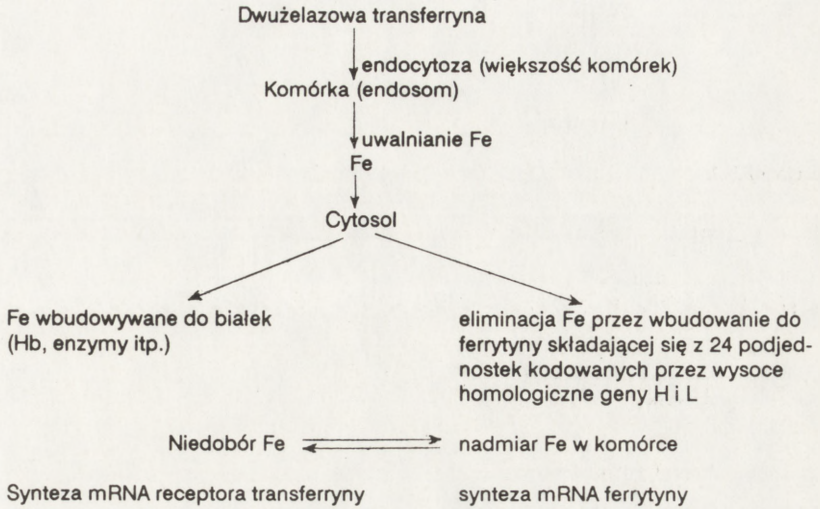
Obecnie najlepiej poznanym modelem jest regulacja ekspresji genów ferrytyny i receptora transferryny. Najpierw wykryto w niekodującym fragmencie 3' mRNA receptora transferryny obecność pętli, powodujących w obecności żelaza gwałtowną degradację tego mRNA [66]. Podobną strukturę wykryto w niekodującym 5' fragmencie mRNA ferrytyny [12], kontrolującej jego translację.

Aby zrozumieć mechanizm regulacji genów ferrytyny i receptora transferryny, konieczne jest zapoznanie się z udziałem wymienionych substancji w krążeniu żelaza (rys. 5). Nowsze badania wykazały, że większość komórek wchłania żelazo w postaci dwużelazowej transferryny w drodze endocytozy. Dzięki odpowiednim enzymom żelazo w endosomach ulega uwolnieniu przechodząc do cytosolu, gdzie zostaje wbudowane do różnych związków, głównie enzymów użytkujących żelazo do swych czynności oraz poprzez hem do globiny. Nadmiar nieużytego żelaza ulega związaniu z ferrytyną. Ferrytyna stanowi sferyczne, wewnątrz "puste" białko składające się z 24 podjednostek kodowanych przez dwa wysoce homologiczne geny H i L [44].

Z chwilą pojawienia się tlenu i żelaza w atmosferze ziemskiej, żywe organizmy zaczęły inkorporować żelazo i używać jego związków na swe potrzeby. Ze względu na toksyczność hydroksy-rodników, powstających podczas utleniania jonu żelazawego na trudno rozpuszczalny jon żelazowy, musiały wykształcić się odpowiednie mechanizmy odtruwające. U wyższych organizmów rolę odtruwacza pełni układ receptor transferryny (*TfR*)-ferrytyna. Niedobór żelaza w komórce stymuluje syntezę receptorów transferryny przenoszących żelazo do miejsc syntezy związków zużywających żelazo do swych czynności. Z kolei nadmiar żelaza w komórce wywołuje efekt odwrotny, tj. zahamowanie syntezy *TfR* z jednoczesnym pobudzeniem syntezy ferrytyny, wiążącej żelazo w nietoksycznej postaci [44]. Jak się przekonano, zwiększenie syntezy zarówno *TfR*, jak i ferrytyny wymaga obecności zwiększonej ilości odpowiedniego mRNA [42, 44, 56]. Z kolei, zmniejszenie syntezy tych białek jest spowodowane zmniejszoną ilością odpowiednich mRNA.

Istotne zagadnienie stanowi mechanizm powodujący z jednej strony zwiększoną ilość odpowiedniego mRNA, z drugiej jego zmniejszenie odpowiednio do zapotrzebowania organizmu. Jak przedstawiono na rysunku 6, mechanizm ten w głównej mierze zależy od obecności w mRNA *TfR* i ferrytyny cis-aktywnych, zbliżonych w swej strukturze elementów RNA łączących się z *TfR* lub ferrytyną. Elementy te określa się jako "elementy reagujące na żelazo" (*IRE = iron responsive elements*). Elementy *IRE* wchodzi w interakcję z tym samym białkiem (*IRE-binding protein = IRE-BP*). *IRE* ferrytyny znajduje się w postaci pojedynczej pętli w 5' niekodującym fragmencie jego mRNA, natomiast szereg elementów *IRE TfR* – w postaci kilku pętli w niekodującym fragmencie 3' tegoż mRNA [42, 44, 56].

Jak przedstawiono na rysunku 6, związanie *IRE* mRNA ferrytyny z *IRE-BP* powoduje zablokowanie translacji i tym samym zmniejszenie syntezy ferrytyny, natomiast wolny *IRE*



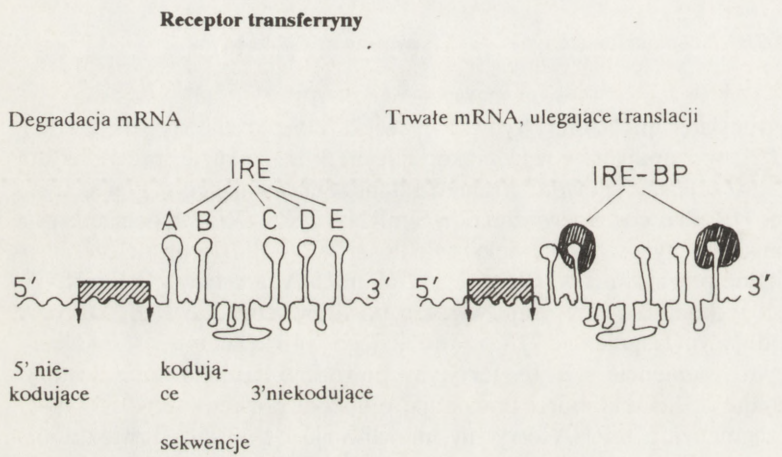
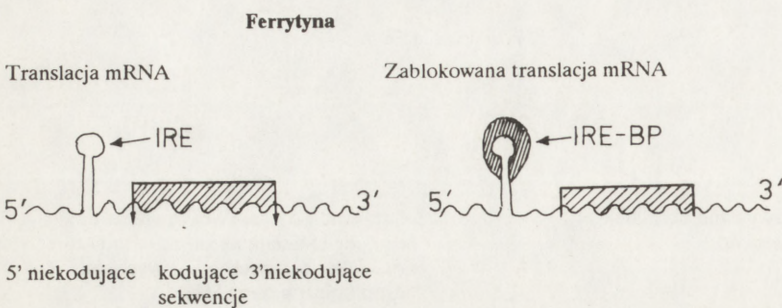
RYS. 5. Krążenie żelaza w organizmach wyższych

umożliwia normalną translację mRNA ferrytyny, czyli zwiększenie ilości ferrytyny. Z kolei wolne *IRE* mRNA *TfR*, występujące w jego niekodującym 3' fragmencie, prowadzi do szybkiej degradacji tegoż mRNA z powodu braku działania ochraniającego i tym samym do zmniejszenia ilości *TfR*. Przeciwnie związanie *IRE* mRNA *TfR* z *IRE-BP* ochrania go, umożliwiając jego translację i tym samym zwiększenie ilości *TfR* [44]. Istotne znaczenie w tym procesie ma zmienne powinowactwo *IRE-BP* do *IRE* mRNA ferrytyny i *IRE* mRNA *TfR*. Niedobór żelaza w komórce powoduje wysokie powinowactwo do *IRE*, którego lokalizacja w 3' niekodującym fragmencie *TfR* powoduje jego syntezę, natomiast lokalizacja w 5' niekodującym fragmencie mRNA ferrytyny powoduje zablokowanie syntezy ferrytyny. Z kolei nadmiar żelaza w komórce powodując obniżone powinowactwo *IRE-BP*, znajdującego się we fragmencie 5' mRNA ferrytyny, umożliwia jego translację i zwiększoną syntezę ferrytyny, zaś brak wiązania z *IRE* mRNA *TfR*, powodując jego rozpad, zmniejsza syntezę *TfR* [44]. Istota zmiany powinowactwa *IRE-BP* do *IRE* nie została dotąd jednoznacznie wyjaśniona.

Przykład potranskrypcyjnej regulacji ekspresji genu zasługuje na szczególną uwagę, gdyż w tym wypadku do wystąpienia wpływu danego białka (*IRE-BP*) na regulację ekspresji genu niepotrzebna jest jego regulowana synteza, a jedynie zmiana powinowactwa w stosunku do regulowanych substancji.

## RECEPTORY HORMONÓW STERYDOWYCH W REGULACJI EKSPRESJI GENU

Szczególnie dużo w dziedzinie regulacji ekspresji genów eukaryotów wniosły badania receptorów hormonów sterydowych, których aktywność pojawia się dzięki wiązaniu ze specyficznymi ligandami. W obrębie receptora hormonów sterydowych rozróżnia się trzy zasadnicze domeny:



IRE – iron-responsive element (element reagujący na żelazo)  
 IRE-BP – IRE-binding protein (białko wiążące IRE)

Niedobór Fe w komórce → wysokie powinowactwo IRE-BP  
 Nadmiar E w komórce → niskie powinowactwo IRE-BP

RYS. 6. Schemat koordynacyjnej ekspresji genów ferrytyny i receptora transferyny – objaśnienia w tekście (przerysowane za [44], częściowo zmienione)

- N-terminalny koniec spełniający rolę aktywatora transkrypcji,
- część środkową, służącą wiązaniu z DNA i
- C-terminalny koniec, wiążący poszczególne hormony [95].

Spontaniczne mutanty receptorów hormonów sterydowych są rzadkie. Większość znanych mutantów wykazano w hodowlach komórkowych, szczególnie w chłoniakach mysich złożonych z komórek T oraz ludzkich komórek białaczek limfoblastycznych, które w obecności prawidłowych receptorów reagują na podanie glukokortykoidów zahamowaniem wzrostu i lizą komórek. Stąd na zasadzie oporności na działanie glukokortykoidów

GU  
 A G  
 CU  
 AU  
 AU  
 CG  
 UG  
 UA  
 C  
 GC  
 U  
 CG  
 CG  
 U  
 UA  
 UA  
 GC  
 GC  
 5' GC 3'  
 IRE ferrytyny  
 ludzkiej  
 G U  
 A G  
 C C  
 GC  
 AU  
 AU  
 GC  
 GC  
 C  
 UA  
 AU  
 UA  
 UA  
 AU  
 AU  
 UA  
 AU  
 5' 3'  
 IRE B recep-  
 tora transferyny

można wydzielić komórki o zmutowanym receptorze. Spośród wielu takich mutantów wyodrębniono cztery zasadnicze grupy:

$r^-$  – brak receptora,

$nt^-$  – defekt w przechodzeniu do jądra komórkowego (*nuclear transfer deficient*),

$nt^i$  – zwiększone przechodzenie do jądra komórkowego (*increased nuclear transfer*),

$act^l$  – o labilnej aktywacji (*activation labile*) [28].

Fenotyp  $r^-$  jest najczęściej wykrywany i cechuje się brakiem lub niedostatecznym wiązaniem hormonu – przyczyną tego jest brak ekspresji właściwego genu (odpowiedni mRNA jest niewykrywalny) [29]. Przyczyną tego zaburzenia jest nieznaną – dotąd nie wykryto większych delecji lub przegrupowań [69]. Warianty  $nt^-$  wykazują słabsze wiązanie hormonu w jądrze komórkowym oraz słabsze powinowactwo do DNA w przeciwieństwie do wariantu  $nt^i$  wykazującego zwiększone wiązanie do jąder komórkowych oraz nadmierne powinowactwo do DNA. Również w tych przypadkach, mimo pewnych zmian elektroforetycznych w żelu poliakrylamidowym, nie wykazano większych delecji lub przegrupowań [63]. Stąd przypuszcza się, że w wariantach  $nt^-$  oraz  $nt^i$  zmiany te mogą być spowodowane zaburzeniami *splicing* [29]. Ostatnio wykazano, że w przypadku wariantu  $nt^-$  u myszy w pozycji 484 domeny wiążącej DNA, zamiast argininy występuje histydyna. Substytucja ta jest prawdopodobnie przyczyną zaburzeń wiązania tego receptora z DNA [21]. Warianty  $act^l$  są bardzo labilne i wykazują podobne cechy, jak kowalencyjnie związany hormon niezdolny do dysocjacji pod wpływem aktywacji [24].

Receptory glukokortykoidów są bardzo wrażliwe na działanie enzymów proteolitycznych. Przeprowadzone badania pozwoliły na wyodrębnienie trzech domen, z których jedna służy wiązaniu hormonów sterydowych, druga wiązaniu z DNA i wreszcie trzecia określona jako modulująca ma dość szeroki zakres działania. Brak tej domeny powoduje przede wszystkim nadmierne wiązanie się tych receptorów z DNA, przy czym nie jest to wiązanie wynikające ze swoistego powinowactwa. To nieprawidłowe wiązanie uniemożliwia dostęp prawidłowych receptorów do DNA, czego następstwem jest zmniejszona aktywacja genów produkujących te receptory. Dalsze badania nad wprowadzeniem modulującej domeny do komórek  $r^-$  sugerują, że domena ta pozwala na specyficzną dyskryminację pomiędzy specyficznymi a niespecyficznymi miejscami wiązania się do DNA. Wreszcie wykazano, że pasmo ok. 100 reszt aminokwasowych domeny modulującej jest odpowiedzialne za jej wpływ na proces aktywacji genów produkujących receptory hormonów sterydowych [28].

Badania szeregu delecji receptora glukokortykoidów w obrębie domeny wiążącej hormon wykazały bardzo ciekawe zjawisko aktywacji genu bez udziału hormonu. Delecje receptora aż do 180 C-terminalnej reszty aminokwasowej znosiły reakcję biologiczną na hormon, natomiast dalsze delecje w kierunku C-terminalnego końca receptora powodowały aktywację genu również w nieobecności hormonu. "Obcinanie" cząsteczki receptora z obydwu końców (C- i N-terminalnego) powodowało stałą konstytutywną aktywację genu [28, 63]. Badania te sugerują, że region receptora wiążący hormon w stanie niezwiązanym powoduje represję funkcji receptora, a z kolei związanie z hormonem sterydowym na skutek zmian konformacyjnych cząsteczki prowadzi do odślonienia domeny aktywującej transkrypcję [28, 95].

Poziom cholesterolu w komórkach ssaków jest między innymi regulowany przez represję transkrypcji genu receptora *LDL* (*low density lipoprotein*) warunkującego wchłanianie cholesterolu oraz enzymów syntezy cholesterolu. Kluczową rolę w hamowaniu syntezy (represji) wymienionych genów jest sekwencja promotorowa *SRE* (*sterol regulatory*

*element*), wiążąca się z białkami regulującymi receptory *LDL* i hormonów sterydowych. Spośród białek łączących się z *SRE* wyodrębniono białko zawierające siedem wysoce konserwatywnych "palców cynkowych", o cechach zbliżonych do białek wiążących się z kwasami nukleinowymi pochodzenia retrowirusowego, co nadaje temu białku charakter białka kontrolującego transkrypcję w sprzężeniu z poziomem cholesterolu w komórce [79].

W przypadku hormonów sterydowych wykazano działanie synergistyczne spowodowane łączeniem się hormonów w kilku miejscach *SRE*. Synergistyczne działanie może wynikać z kooperacji czynników *cis* i *trans* poprzez interakcję białko-białko, jak to występuje w przypadku represora  $\lambda$  [75], względnie też dwa aktywatory (hormony) wiążą się z *SRE* niezależnie ze swymi elementami *cis*, które z kolei łączą się pomiędzy sobą trzecim białkiem umożliwiającym kooperację [75, 93].

Receptory hormonów sterydowych zostały zidentyfikowane w bardzo licznych genach [3] (przykładowo: ludzki gen metalotioneiny, króliczy uteroglobiny, kurzej witelogeniny II i innych). Zasięg miejsc wiążących czysty receptor hormonów sterydowych określony jako *HRE* (*hormone regulatory element*) wynosi od 2700 pz przed miejscem startu transkrypcji (dla genu receptora uteroglobiny królika) do 100 pz poza miejscem startu transkrypcji dla genu receptora ludzkiego hormonu wzrostu, zaś dla genu receptora progesteronu królika nawet 1000 pz poza miejscem startu transkrypcji [3]. Ze względu na tak szeroki zakres wiązania *HRE*, czynniki wiążące się z tym elementem zalicza się do kategorii *enhancer*.

Swoistość wiązania receptorów z odpowiednimi hormonami jest bardzo wysoka. Wynika to z badań receptorów hormonów minimalnie różniących się. W przypadku receptora dla estrogenu i glukokortykoidu wysoce konserwatywny odcinek aminokwasów receptora wynosi 66 reszt aminokwasowych w domenie C-terminalnej. Region ten zawiera dwa subregiony CI i CII analogiczne do "palców cynkowych" czynnika transkrypcji *TFIIIA*, z tego N-terminalny koniec CI stanowi o specyficzności elementu odpowiedzialnego za rozpoznawanie hormonu. W tym 3 ostatnie reszty aminokwasowe, bliższe C-terminalnego końca, są decydującymi dla rozpoznania estrogenu [48, 52, 91].

Analiza receptorów hormonów sterydowych wykazała, że nie tylko one, lecz ponad to jeszcze receptory hormonów tarczycy i retinoidów należą do tej samej rodziny, co znakomicie ułatwia koordynacyjne działanie w okresie tworzenia narządów, jak i później w homeostazie organizmu poprzez wiązanie odpowiednich ligandów [26]. Receptory te stanowią czynniki transkrypcji, które mogą zarówno aktywować transkrypcję odpowiednich genów, jak i powodować ich represję. Na przykładzie hormonów sterydowych widać, jak przebiega ich wzajemna gra prowadząc do ostatecznego fizjologicznego efektu. I tak: ekspresja genu reportera receptora progesteronu ulega zahamowaniu w przypadku koekspresji genów produkujących estrogeny – ten efekt zahamowania można znieść przez anti-estrogeny [42, 91]. Aktywacja genów receptora estrogenów zostaje zahamowana wskutek aktywacji genu receptora glukokortykoidów i wreszcie jednoczesna aktywacja genów receptorów progesteronu i glukokortykoidów zostaje zahamowana przez aktywację genu receptora estrogenów [48, 59, 91].

Nowoczesna biologia molekularna wykazała, że aktywacja komórek o pokrewnym lub uzupełniającym działaniu odbywa się nie tylko przez anatomiczne sąsiedztwo, ale również aktywację genów. Takim typowym przykładem jest przysadka mózgowa, w której występuje pięć fenotypowo różnych komórek, włączając w to komórki produkujące zarówno hormon wzrostu, jak i prolaktynę. Badania przeprowadzone na przysadce szczura wykazały, że aktywacja genów hormonu wzrostu i prolaktyny odbywa się przez wspólny tkankowo-



swoisty aktywator transkrypcji, określony jako Pit-1. Dane te sugerują, że w toku rozwoju ten sam aktywator może uaktywnić geny różnych komórek produkujących swoiste dla tych komórek produkty [67]. Jednocześnie receptory hormonów mogą wywierać również podwójne działanie. I tak wykazano, że receptory hormonów tarczycy w obecności hormonu tarczycy działają na specyficzne, zależne od hormonów tarczycy elementy DNA (określone jako *TRE*) powodując aktywację transkrypcji, natomiast w nieobecności hormonów tarczycy działają na *TRE* jako represory transkrypcji [32].

Badania przeprowadzone z produktem v-erb-A onkogeny, występującego pod wpływem ekspresji wirusa ptasiej erythroblastozy lub wirusa białaczki mysiej Moloneya wykazały identyczność komórkowego homologu tego onkogeny z receptorem hormonów tarczycy. Onkogen ten blokuje różnicowanie komórek erytroidalnych. Mutacje białka v-erb-A powodowały utratę jego powinowactwa do hormonów tarczycy, jednak bez utraty zdolności wiązania się z DNA. Stąd ekspresja zmutowanego onkogeny v-erb-A prowadzi do braku wiązania hormonów tarczycy. Dzięki tym badaniom wykazano, że białko v-erb-A jest antagonistą receptora hormonu tarczycy, będąc przykładem dominującego negatywnego onkogeny [20, 40, 41, 84].

## REGULACJA TRANSKRYPCJI POPRZEZ INTERAKCJĘ BIAŁEK

Nie wszystkie czynniki regulujące ekspresję genów działają poprzez bezpośrednie wiązanie z DNA. Szereg współczesnych badań dowiodło, że interakcja niektórych czynników transkrypcji z promotorem odbywa się poprzez interakcję białko-białko. Do tej grupy należą przede wszystkim niektóre onkogeny, regulujące transkrypcję bez bezpośredniego łączenia się w sposób specyficzny z DNA (np. fos, myc, AIA i inne). Onkogeny v-fos lub v-myc mogą aktywować transkrypcję drożdży po fuzji z domeną wiążącą DNA bakteryjnego represora *lexA*, co sugeruje, że mają one transkrypcyjną aktywność również u wyższych organizmów. Fos wiąże się z miejscem rozpoznawania DNA białka AP-1 prawdopodobnie poprzez interakcję białko-białko. Stąd ekspresja fos w komórkach ssaków odbywa się poprzez interakcję z domeną AP-1 wiążącą DNA [95].

Typowym przykładem działania kompleksów białkowych na proces transkrypcji przedstawiają receptory hormonów sterydowych, ulegających transformacji pod wpływem wiązania z właściwym hormonem. Nieaktywny czynnik transkrypcji występuje w cytoplazmie w postaci związanej z białkiem szoku termicznego hsp90. Pod wpływem połączenia hormonu, kompleks receptora z hsp90 dysocjuje, po czym receptor łączy się z właściwym miejscem DNA (zależnym od rodzaju liganda), powodując aktywację lub represję transkrypcji. Represyjny charakter kompleksu receptora z hsp90 polega na wiązaniu miejsca wiązania sterydu receptora [62].

Wiele spośród białek wirusowych o charakterze aktywatorów lub represorów transkrypcji działa bez bezpośredniego wiązania się z promotorami DNA. Trans-aktywacja tych czynników odbywa się zazwyczaj poprzez interakcję białko-białko z czynnikami wiążącymi się z DNA. Przykładowo białko E1A adenowirusa 2 działa jako czynnik *trans* za pośrednictwem czynnika *TFIID* lub *ATF*. Transaktywacyjna czynność E1A została zlokalizowana na odcinku 49 reszt aminokwasowych obecnych w większej podjednostce tego białka powstałego w drodze zróżnicowanego *splicing* [50, 62]. Również transaktywujące efekty

białka wirusa opryszczki VP16 są zależne od dwóch różnych elementów *cis* promotora. VP16 nie ma domeny wiążącej DNA, ma natomiast bardzo silną domenę kwasową aktywującą transkrypcję (na C-terminalnym końcu) – stąd dla swego działania potrzebuje połączenia z białkiem wiążącym się z DNA [62]. E1A może powodować represję niektórych wirusowych lub komórkowych elementów *enhancera* poprzez domenę niezależną od domeny aktywującej. Wreszcie antygen większy T wirusa SV40 może powodować zarówno aktywację, jak i represję transkrypcji przez dwa niezależne mechanizmy:

1° Steryczny blok inicjacji z wczesnego promotora SV40 poprzez wiązanie z DNA powoduje zasłonięcie miejsca inicjacji transkrypcji.

2° Antygen T może tworzyć kompleks z komórkowym czynnikiem transkrypcji AP-2 hamując w ten sposób wiązanie AP-2 z elementem *enhancera* SV40 o istotnym znaczeniu dla wczesnej transkrypcji [62].

W przypadku nieobecności sekwencji TATA inicjacja transkrypcji rozpoczyna się od dotąd bliżej nieokreślonych sekwencji kontrolnych. W przypadku terminalnej transferazy dezoksyrybonukleotydylowej wykazano obecność elementu 17 pz zabezpieczającego właściwe miejsce inicjacji transkrypcji zarówno *in vitro*, jak i *in vivo*. Element ten nazwano "inicjatorem" [88].

Ostatnio wykazano, że regulacja ekspresji genu eukaryotów i to w sensie zarówno aktywacji, jak i hamowania może odbywać się również poprzez *splicing* [5]. Dotąd badania w tym zakresie przeprowadzono głównie na roślinach i niektórych owadach. Powiązanie aktywacji lub inaktywacji procesu transkrypcji, którego częścią składową jest *splicing*, wydaje się oczywiste. Sposób, w jaki te dwa procesy się zająbiają, polega na obecności odpowiednich białek sterujących tymi procesami [5]. Sądzi się, że wpływ procesu *splicing* na aktywację lub inaktywację genów eukaryotów jest dość znaczny.

#### REGULACJA AKTYWNOŚCI CZYNNIKÓW TRANSKRYPCJI PRZEZ POTRANSLACYJNE MODYFIKACJE

Przyjmuje się, że białka (względnie ich składowe) są stale obecne w komórce i dopiero dzięki odpowiednim bodźcom następuje ich aktywacja (poprzez cAMP, jony wapnia lub inne czynniki pośredniczące). Ponieważ większość czynników biorących udział w procesie transkrypcji jest fosfoproteinami, sugeruje się, że regulacyjna funkcja tych białek polega na fosforylacji-defosforylacji [62]. Niezależnie, również glikozylacja może być elementem regulującym. Typowym przykładem aktywacji poprzez glikozylację jest czynnik Sp1 z komórek HeLa, który prócz fosforylacji ulega również glikozylacji, przyłączając na jedną cząsteczkę 10 O-związanych N-acetyloglikozamin [62].

### ROLA rRNA W SYNTEZIE BIAŁEK

Obok transkrypcji, translacja stanowi niewątpliwie również ważny czynnik regulacji ekspresji genów. Dotąd główną rolę w tym procesie przypisywano białkom rybosomów. Obecnie, zwłaszcza po wykryciu enzymatycznej funkcji kwasów rybonukleinowych, również ważną rolę, a może nawet ważniejszą, przypisuje się mało dotąd poznanej funkcji rRNA. Tymczasem nowsze badania wykazały, że rRNA odgrywa decydującą rolę we wszystkich procesach translacji, a więc w inicjacji, elongacji i terminacji translacji, nas-

tępnie w asocjacji podjednostek rybosomów, dekodacji, czyli prawidłowym odczytywaniu kodu genetycznego, w czynności transferazy peptydylowej oraz translokacji syntetyzującego się łańcucha peptydowego z miejsca A do P rybosomów. Mutacje rRNA, jak wykazały odpowiednie badania, prowadzą do szeregu zaburzeń translacji i tym samym do zaburzeń ekspresji genów ( w pozycji 19 literatury zamieszczono obszerny przegląd roli rRNA i zaburzeń translacji, spowodowanych mutacjami rRNA, których tutaj bliżej nie mogę omawiać). Inny rodzaj zaburzeń ekspresji genów może wynikać z alternatywnych translacji z powodu inicjacji translacji z innych miejsc mRNA, aniżeli inicjacji od końca 5' mRNA. Jak wiadomo, kodonem rozpoznawanym przez podjednostkę 40S rybosomów jest AUG. Tymczasem nowsze badania wykazały, że inicjacja translacji może wystąpić również z kodonów AUG występujących w dalszych regionach zarówno komórkowych, jak i wirusowych mRNA, powodując syntezę różnych białek, zwłaszcza że wybór dalszych kodonów AUG może spowodować zmiany ram odczytu i tym samym wielorakie wykorzystanie tego samego kodu genetycznego do syntezy różnych białek [36]. Dane te sugerują, że powszechnie dotąd uznawany dość prosty model działania kodu genetycznego DNA → RNA → białko; może ulec znacznym zmianom, co w konsekwencji może znacznie zwiększyć liczbę syntetyzowanych białek w organizmie, niżby to wynikało z obecnie powszechnie przyjętego modelu, w którym liczba białek jest ograniczona do liczby trypletów występujących w tej części DNA, która koduje syntezę białek.

Zagadnień wielorakiej potranslacyjnej regulacji ekspresji genów syntezy hemu nie poruszam, jako przekraczających ramy niniejszego opracowania.

#### PODZIĘKOWANIE

Na zakończenie poczuwam się do miłego obowiązku podziękowania prof. drowi Hilaremu Koprowskiemu, dyrektorowi Instytutu Wistara w Filadelfii (USA) za zaproszenie i sfinansowanie dwumiesięcznego pobytu w USA, co umożliwiło mi zebranie odpowiedniej literatury do opracowania niniejszego przeglądu.

#### LITERATURA

- [1] ABEL T. Action of leucine zippers. *Nature* 1989; **341**: 24–25.
- [2] BEAR DG, PEABODY DS, The *E. coli* Rho protein: ATPase that terminates transcription. *TIBS* 1988; **13**: 343–345.
- [3] BEATO M. Induction of transcription by steroid hormones. *BBA* 1987; **910**: 95–102.
- [4] BERG OG, v. HIPPEL PH. Selection of DNA binding sites by regulatory proteins. *TIBS* 1988; **13**: 207–211.
- [5] BINGHAM PM, CHOU T-B, MINS I, ZACHAR Z. On/off regulation of gene expression at the level of splicing. *TIG* 1988; **4**: 134–138.
- [6] BRAWERMAN G. mRNA decay: finding the right targets. *Cell* 1989; **57**: 9–10.
- [7] BRAWERMAN G. Determinants of messenger RNA stability. *Cell* 1987; **48**: 5–6.
- [8] BREWER G, ROSS J. Poly(A) shortening and degradation of the 3'A + U rich sequences of human c-myc mRNA in cell-free system. *Mol Cell Biol* 1988; **8**: 1697–1708.
- [9] BUCHER P, TRIFONOV EN. Compilation of analysis of eukaryotic POL II promoter sequences. *Nucl Acids Res* 1986; **14**: 10009–10026.
- [10] BUSHMAN FD, SHANG C, PTASHNE M. A single glutamic acid residue plays a key role in the transcriptional activation function lambda repressor. *Cell* 1989; **58**: 1163–1171.
- [11] CAPUT D, BEUTLER B, HARTOG A, THAYER R, BROWN-SHIMAR R, CERAMI A. Identification of a common nucleotide sequence in the 3'untranslated region of mRNA molecules specifying inflammatory mediators. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; **83**: 1670–1674.

- [12] CASEY JL, HENTZE MW, KOELLER DM, CAUGHMAN SW, ROUAULT TA, KLAUSNER RD, HARDFORD JB. Iron responsive elements: regulatory sequences that control mRNA levels and translation. *Science* 1988; **240**: 924-928.
- [13] CEDAR H. DNA methylation and gene activity. *Cell* 1988; **8**: 3-4.
- [14] CHIU R, BOYLE WJ, MEEK J, SMEAL T, HUNTER T, KARIN M. The c-fos protein interacts with c-Jun/AP-1 to stimulate transcription of AP-1 responsive genes. *Cell* 1988; **54**: 541-552.
- [15] CHODOSH LA, BALDWIN AS, CARTHEW RW, SHARP PA. Human CCAAT-binding proteins have heterologous subunits. *Cell* 1988; **53**: 11-24.
- [16] CHODOSH LA, OLESEN J, HAHN S, BALDWIN AS, GUARANTE L, SHARP PA. A yeast and a human CCAAT-binding protein have heterologous subunits that are functionally interchangeable. *Cell* 1988; **53**: 25-35.
- [17] CISEK LJ, CORDEN JL. Phosphorylation of RNA polymerase by the murine homologue of the cell-cycle control protein cdc2. *Nature* 1989; **339**: 679-684.
- [18] CLEVELAND DW. Autoregulated instability of tubulin mRNAs: a novel eukaryotic regulatory mechanism. *TIBS* 1988; **13**: 339-342.
- [19] DAHLEBERG AE. The functional role of ribosomal RNA in protein synthesis. *Cell* 1989; **57**: 525-529.
- [20] DAMM K, THOMPSON CC, EVANS RM. Protein encoded by v-erbA functions as a thyroid-hormone receptor antagonist. *Nature* 1989; **339**: 593-597.
- [21] DANIELSEN JEFFREY P, NORTHROP JP, RINGOLD GM. The mouse glucocorticoid receptor: mapping off functional domains by cloning sequencing and expression of wild type and mutant receptor proteins. *EMBO J* 1986; **5**: 2513-2522.
- [22] DAVISON BL, EGLY JM, MULVIHIL ER, CHAMBON P. Formation of stable preinitiation complexes between eukaryotic class B transcription factors and promoter sequences. *Nature* 1983; **301**: 680-686.
- [23] DYNAN WS. Understanding the molecular mechanism by which methylation influences gene expression. *TIG* 1989; **5**: 35-36.
- [24] EISEN LP, ELSASSER MS, HARMON JM. Positive regulation of the glucocorticoid receptor in human T-cells sensitive to the cytolytic effects of glucocorticoids. *J Biol Chem* 1988; **263**: 12044-12048.
- [25] EISENMANN DM, DOLLARD C, WINSTON F. SPT15, the gene encoding the yeast TATA binding factor TFIID, is required for normal transcription initiation in vivo. *Cell* 1989; **58**: 1183-1191.
- [26] EVANS RM. The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* 1988; **240**: 889-895.
- [27] FURUICHI J, LAFIANDRA A, SHATKIN AJ. 5'terminal structure and mRNA stability. *Nature* 1977; **266**: 235-239.
- [28] GEHRING U. Steroid hormone receptors: biochemistry, genetics, and molecular biology. *TIBS* 1987; **12**: 399-402.
- [29] GEHRING U. Genetics of glucocorticoid receptors. *Mol Cell Endocrinol* 1986; **48**: 89-96.
- [30] GINGER E, PTASHNE M. Cooperative DNA binding of the yeast transcriptional activator GAL4. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; **85**: 382-386.
- [31] GORSKI K, CARNEIRO M, SCHIBLER U. Tissue-specific in vitro transcription from the mouse albumin promoter. *Cell* 1986; **47**: 767-776.
- [32] GRAUPNER G, WILLS KN, TZUKERMAN M, ZHANG X-K, PFAHL M. Dual regulatory role for thyroid-hormone receptors allows control of retinoic-acid receptor. *Nature* 1989; **340**: 653-656.
- [33] GUARANTE L. UASs and enhancers: common mechanism of transcriptional activation in yeast and mammals. *Cell* 1988; **52**: 303-305.
- [34] HAHN S, BURATOWSKI S, SHARP PA, GUARANTE L. Isolation of the gene encoding the yeast TATA binding protein TFIID: a gene identical to the SPT15 suppressor of Ty element insertions. *Cell* 1989; **58**: 1173-1181.
- [35] HAIT, HORIKOSHI M, ROEDER RG, GREEN MR. Analysis of the role of the transcription factor ATF in the assembly of a functional preinitiation complex. *Cell* 1988; **54**: 1043-1051.
- [36] HERMAN RC. Alternatives for the initiation of translation. *TIBS* 1989; **14**: 219-222.
- [37] HIRASHIMA S, HIRAI H, NAKANISHI Y, NATORI S. Molecular cloning and characterization of cDNA for eukaryotic transcription factor S-II. *J Biol Chem* 1986; **261**: 11064-11070.
- [38] HORIKOSHI M, WANG CK, FUJI H, CROMLISH JA, WEIL PA, ROEDER RG. Cloning and structure of a yeast gene encoding a general transcription initiation factor TFIID that binds to the TATA box. *Nature* 1989; **341**: 299-303.
- [39] HORIKOSHI M, HAI T, LIN Y-S, GREEN MR, ROEDER RG. Transcription factor ATF interacts with the TATA factor to facilitate establishment of a preinitiation complex. *Cell* 1988; **54**: 1033-1042.

- [40] HERSKOWITZ I. Functional inactivation of genes by dominant negative mutations. *Nature* 1987; **329**: 219-222.
- [41] HERSKOWITZ I. A regulatory hierarchy for cell specialisation in yeast. *Nature* 1989; **342**: 749-757.
- [42] KAGEYAMA R, PASTAN I. Molecular cloning and characterization of a human DNA binding factor that represses transcription. *Cell* 1989; **59**: 815-825.
- [43] KAKIDANI H, PTASHNE M. GAL4 activates gene expression in mammalian cells. *Cell* 1988; **52**: 161-167.
- [44] KLAUSNER R, HARFORD JB. Cis-trans models for post-transcriptional gene regulation. *Science* 1989; **246**: 870-872.
- [45] KLUG A, RHODES D. Zinc finger: a novel protein motif for nucleic acid recognition. *TIBS* 1987; **12**: 464-469.
- [46] KOUZARIDES T, ZIFF E. Leucine zippers of fos, jun and GCN4 dictate dimerization specificity and thereby control DNA binding. *Nature* 1989; **340**: 568-571.
- [47] LANDSCHUTZ WH, JOHNSON PF, McKNIGHT SL. The leucine zipper: a hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins. *Science* 1988; **240**: 1759-1764.
- [48] LEVINE M, MANLEY JL. Transcriptional repression of eukaryotic promoters. *Cell* 1989; **59**: 405-408.
- [49] LILLIE JW, GREEN MR. Activators target in sight. *Nature* 1989; **341**: 279-280.
- [50] LILLIE JW, GREEN MR. Transcription activation by the adenovirus E1a protein. *Nature* 1989; **338**: 39-44.
- [51] MA J, PTASHNE M. Converting a eukaryotic transcriptional inhibitor into an activator. *Cell* 1988; **55**: 443-446.
- [52] MADER S, KUMAR V, DE VERNEUIL H, CHAMBON P. Three amino acids of the oestrogen receptor are essential to its ability to distinguish an oestrogen from a glucocorticoid-responsive element. *Nature* 1989; **338**: 271-274.
- [53] MALTER JS. Identification of an AUUUA-specific messenger RNA binding protein. *Science* 1989; **246**: 664-665.
- [54] MANIATIS T, GOODBOURNS, FISHER JA. Regulation of inducible and tissue-specific gene expression. *Science* 1987; **236**: 1237-1245.
- [55] MARZLUFF WF, PANDEY NB. Multiple regulatory steps control histone mRNA concentrations. *TIBS* 1988; **13**: 49-51.
- [56] MATTIA E, BLAAUWEN J, den ASHWELL G, RENSWOUDE van J. Multiple post-transcriptional regulatory mechanisms in ferritin gene expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; **86**: 1801-1805.
- [57] McCORMACK K, CAMPANELLI JT, RAMASWANI M, MATHEW MK, TANOUYE MA. Leucine-zipper motif update. *Nature* 1989; **340**: 103.
- [58] MERMELSTEIN FH, FLORES O, REINBERG D. Initiation of transcription by RNA polymerase II. *BBA* 1989; **1009**: 1-10.
- [59] MEYER M-E, GRONEMEYER H, TURCOTTE B, BOCQUEL M-T, TASSET D, CHAMBON P. Steroid hormone receptors compete for factors that mediate their enhancer function. *Cell* 1989; **57**: 433-442.
- [60] MILLER AD, CURRAN T, VERMA IM. c-fos protein can induce cellular transformation: a novel mechanism of activation of a cellular oncogene. *Cell* 1984; **36**: 51-60.
- [61] MILLER J, McLACHLAN AD, KLUG A. Repetitive zinc-binding domains in the protein transcription factor IIIA from *Xenopus* oocytes. *EMBO J* 1985; **4**: 1609-1614.
- [62] MITCHELL PJ, TJIAN R. Transcriptional regulation in mammalian cells by sequence-specific DNA binding proteins. *Science* 1989; **245**: 371-378.
- [63] MIESFELD R, GODOWSKI PJ, MALER BA, YAMAMOTO KR. Glucocorticoid receptor mutants that define a small region sufficient for enhancer activation. *Science* 1987; **236**: 423-427.
- [64] MIYAMOTO NG, MONCOLLIN V, EGLY JM, CHAMBON P. Specific interaction between a transcription factor and the upstream element of the adenovirus-2 major promoter. *EMBO J* 1985; **4**: 3563-3570.
- [65] MIZUSHIMA-SUGANO J, ROEDER RG. Cell-type specific transcription of an immunoglobulin kappa light chain gene in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; **83**: 8511-8515.
- [66] MÜLLNER EW, KÜHN LC. A stem loop in the 3'untranslated region mediates iron-dependent regulation of transferrin receptor mRNA stability in the cytoplasm. *Cell* 1988; **53**: 815-825.
- [67] NELSON Ch, ALBERT VR, ELSHOLZ HP, LU L, ROSENFELD MG. Activation of cell-specific expression of rat growth hormone and prolactin genes by a common transcription factor. *Science* 1988; **239**: 1400-1405.
- [68] NEUBERG M, ADAMKIEWICZ J, HUNTER J, MÜLLER RA. Fos protein containing the Jun leucine zipper forms a homodimer which binds to the AP1 binding site. *Nature* 1989; **341**: 243-245.
- [69] NORTHROP JP, DANIELSEN M, RINGOLD GM. Analysis of glucocorticoid receptor complementary DNA clone. *J Biol Chem* 1986; **261**: 11064-11070.

- [70] O'SHEA EK, RUTKOWSKI R, STAFFORD III WF, KIM PS. Preferential heterodimer formation by isolated leucine zippers from Fos and Jun. *Science* 1989; **245**: 646-648.
- [71] PACHTER JS, YEN TJ, CLEVELAND D. Autoregulation of tubulin expression is achieved through specific degradation of polysomal tubulin mRNAs. *Cell* 1987; **51**: 283-292.
- [72] PICARD B, WĘGENEZ M. Isolation of a 7S particle from *Xenopus laevis* oocytes: A 5SRNA-protein complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979; **76**: 241-245.
- [73] PIECHACZYK M, YANG J, BLANCHARD J, JEANTEUR P, MARCU KB. Post-transcriptional mechanisms are responsible for accumulation of truncated c-myc mRNA in murine plasma cell tumors. *Cell* 1985; **42**: 589-597.
- [74] PROUDFOOT NJ. How RNA polymerase II terminates transcription in higher eukaryotes. *TIBS* 1989; **14**: 105-110.
- [75] PTASHNE M. How eukaryotic transcriptional activators work. *Nature* 1988; **335**: 683-689.
- [76] PTASHNE M. How gene activators work. *Sci Amer*, Jan 1989: 41-47.
- [77] RABBITS PH, FORSTER A, STINSON MA, RABBITS TH. Truncation of exon 1 from the c-myc gene results in prolonged c-myc stability. *EMBO J* 1985; **4**: 3727-3733.
- [78] RAGHOW R. Regulation of messenger RNA turnover in eukaryotes. *TIBS* 1987; **12**: 358-360.
- [79] RAJAVASHISTH TB, TAYLOR AK, ANDALIBI A, SVENSON KL, LUSIS AJ. Identification of a zinc finger protein that binds to the sterol regulatory element. *Science* 1988; **245**: 640-643.
- [80] RICE PA, STEITZ T. Ribosomal protein L7/L12 has a helix-turn-helix motif similar to that found in DNA-binding regulatory proteins. *Nucl Acids Res* 1989; **17**: 3757-3762.
- [81] ROSS L. The turnover of messenger RNA. *Sci Amer*, Apr. 1989: 48-55.
- [82] RUDEN DM, PTASHNE M. No strict alignment is required between a transcriptional activator binding site and the TATA box of a yeast gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; **85**: 4262-4266.
- [83] SALTZMAN AG, WEINMANN R. Promoter specificity and modulation of RNA polymerase II transcription. *FASEB J* 1989; **3**: 1723-1733.
- [84] SAP J, MUNOZ A, SCHMITT J, STUNNENBERG H, VENNSTRÖM B. Repression of transcription mediated at a thyroid hormone responsive element by the v-erb-A oncogene product. *Nature* 1989; **340**: 242-245.
- [85] SCHEMA M, YAMAMOTO KR. Mammalian glucocorticoid receptor derivatives enhance transcription in yeast. *Science* 1988; **241**: 965-967.
- [86] SELLARS JW, STRUHL K. Changing Fos oncoprotein to a Jun-independent DNA-binding protein with GCN4 dimerization specificity by swapping "leucine zippers". *Nature* 1989; **341**: 74-76.
- [87] SHAW G, KAMEN R. A conserved AU sequence from the 3'untranslated region of GM-CSF mRNA mediates selective mRNA degradation. *Cell* 1986; **46**: 659-667.
- [88] SMALE ST, BALTIMORE D. The "initiator" as a transcription control element. *Cell* 1989; **57**: 103-113.
- [89] STRUHL K. The Jun oncoprotein, a vertebrate transcription factor, activates transcription in yeast. *Nature* 1988; **332**: 649-650.
- [90] STRUHL K. Helix-turn-helix, zinc-finger, and leucine-zipper motifs for eukaryotic transcriptional regulatory proteins. *TIBS* 1989; **14**: 137-140.
- [91] TORA L, WHITE J, BROU C, T'ASSET D, WEBSTER N, SCHEER E, CHAMBON P. The human estrogen receptor has two independent nonacidic transcriptional activation functions. *Cell* 1989; **59**: 477-487.
- [92] TREISMAN R. Transient accumulation of c-fos RNA following serum stimulation requires a conserved 5'element and c-fos 3'sequences. *Cell* 1985; **42**: 889-902.
- [93] TSAI SY, TSAI M-J, O'MALLEY BW. Cooperative binding of steroid hormone receptors contributes to transcriptional synergism at target enhancer elements. *Cell* 1989; **57**: 443-448.
- [94] VINSON CR, SIGLER PB, MCKNIGHT SL. Scissors-grip model for DNA recognition by a family of leucine zipper proteins. *Science* 1989; **246**: 911-915.
- [95] WASYLYK B. Enhancers and transcription factors in the control of gene expression. *BBA* 1988; **951**: 17-35.
- [96] WEBSTER N, JIN JR, GREEN S, HOLLIS M, CHAMBON P. The yeast UASG is a transcriptional enhancer in human HeLa cells in the presence of the GAL4 transactivator. *Cell* 1988; **52**: 169-178.
- [97] YEN TJ, GAY DA, PACHTER JS, CLEVELAND DW. Autoregulated changes in stability of polyribosome-bound beta-tubulin mRNAs are specific for the 13 first translated nucleotides. *Cell Mol Biol* 1988; **8**: 1224-1235.

Otrzymano: 06.06.1990

Przyjęto: 29.06.1990.

Adres autora: ul. Strzeszyńska 36, 60-479 Poznań

## INFORMACJE DLA AUTORÓW

POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI drukują artykuły przeglądowe z zakresu najnowszych osiągnięć biologii komórki, nie publikowane dotąd w innych wydawnictwach. Autorzy odpowiadają za ścisłość podawanych informacji. Obowiązuje terminologia zgodna z polskim mianownictwem biochemicznym, histologicznym, anatomicznym i embriologicznym. Artykuły drukowane w POSTĘPACH BIOLOGII KOMÓRKI nie mogą być bez zgody redakcji publikowane w innych periodykach.

POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI zamieszczają:

1. Artykuły przeglądowe nie przekraczające 20 stron maszynopisu i do 100 pozycji bibliograficznych w zasadzie z ostatnich 5 lat (do 10% pozycji bibliograficznych starszych).

2. Artykuły przeglądowe ze wskazaniem kierunków przyszłych badań o objętości do 15 stron maszynopisu i bibliografii z ostatnich 3 lat (do 35 pozycji). Każda pozycja bibliograficzna powinna zawierać dodatkowo 1 zdanie streszczenia, a szczególnie ważne pozycje powinny być oznaczone gwiazdką.

3. Doniesienia z ostatniej chwili na 3–5 stronach maszynopisu z kilkoma pozycjami bibliograficznymi ostatniego roku (licząc od daty wysłania do redakcji).

4. Listy do redakcji (do 1 strony maszynopisu).

Tekst pracy i załączniki należy przysyłać w dwóch egzemplarzach. Maszynopis powinien być pisany jednosłownie na papierze formatu A4 z podwójną interlinią i marginesem 4 cm po lewej stronie. Strony powinny być kolejno numerowane. W tekście nie należy robić podkreśleń.

Pierwsza strona nie numerowana przeznaczona jest dla redakcji i powinna zawierać: imiona i nazwiska autorów oraz ich tytuły naukowe, adresy pracy i domowe wraz z telefonem, tytuł pracy w języku polskim i angielskim oraz liczbę stron maszynopisu, liczbę tabel i rysunków. Na pierwszej (numerowanej) stronie należy podać kolejno tytuł pracy w języku polskim i angielskim, imiona (w pełnym brzmieniu) i nazwiska autorów, nazwę zakładu naukowego, nazwisko i adres autora prowadzącego korespondencję i wysyłającego nadbitek, informację o dofinansowaniu pracy oraz skrót tytułu (do 40 znaków). Następna strona powinna zawierać streszczenie (do 150 słów) oraz słowa kluczowe – 3 do 10 słów zgodnych z terminami w Medical Subject Headings (Index Medicus), o ile słowa te są tam zawarte. Streszczenie i słowa kluczowe powinny być przedstawione także w języku angielskim. W tytule i streszczeniu można stosować jedynie powszechnie przyjęte skróty, np. DNA. Tekst artykułu należy rozpocząć od nowej strony. W tekście nie zamieszczać tabel, schematów lub rysunków, lecz jedynie zaznaczyć ołówkiem na marginesie ich lokalizację (np. tab. 1, rys. 1 itp.). Dla przejrzystości tekst można podzielić na rozdziały tytułowane i numerowane (1, 2 itd.) oraz podrozdziały (1.1, 1.2 itd.). Od nowej strony należy podać spis literatury. Skróty nazw czasopism podawać należy według Index Medicus (listy czasopism publikowane są corocznie w numerze styczniowym). Powołanie w tekście następuje przez podanie kolejnego numeru pozycji w spisie literatury w nawiasie kwadratowym (np. [5]). Spis literatury należy zestawzić alfabetycznie według następującego wzoru:

[1] HNİLICA LS, McLURE ME, SPELTZBERG TC. Histone biosynthesis and the cell cycle. [w] Philips MP, Schwartz E, red. Histone and Nucleohistones. London, New York: Philips, Plenum Press 1977: 60–64.

[2] SACHSENMAJER W, REMY V, PLATTNER R. Initiation of synchronous mitosis in *Physarium polycephalum*. *Exptl Cell Res* 1980; 2: 41–48.

Tabele, opisy schematów i rysunków powinny być załączone na oddzielnych stronach. Schematy i rysunki muszą być wykonane w postaci nadającej się do reprodukcji. Fotografie prosiny zastępować raczej rysunkami, ale jeżeli są niezbędne, powinny być kontrastowe i wykonane na błyszczącym papierze. Wymiary poszczególnych rysunków, schematów i fotografii nie mogą przekraczać 125 x 180 mm lub ich połowy. Jeżeli załączniki są zapożyczone z innych źródeł, należy podać, skąd zostały zaczerpnięte i dołączyć zgodę autora i wydawnictwa na reprodukcję, jeżeli materiały te zamieszcza się w niezmięnionej formie. Wszystkie załączniki muszą być opatrzone na odwrocie nazwiskiem pierwszego autora i oznaczeniem góry i dołu ilustracji

Stosowane jednostki miar muszą być zgodne z układem SI.

Redakcja zastrzega sobie prawo dokonywania skrótów uzgodnionych z autorem. Autor zobowiązany jest do wykonania korekty autorskiej i zwrócenia jej w ciągu 3 dni. Koszty, spowodowane większymi zmianami tekstu wprowadzanymi w korekcie poza poprawkami błędów drukarskich, ponosi autor. Autorzy otrzymują bezpłatnie 25 nadbitek.

## TREŚĆ

---

TRETYN A. – Mechanizm działania acetylocholino w roślinach	97
HAUS O. – Genetyczne aspekty oporności komórek nowotworowych na cytostatyki	
I. Mechanizmy oporności na pojedyncze cytostatyki	113
HAUS O. – Genetyczne aspekty oporności komórek nowotworowych na cytostatyki	
II. Oporność wielolekowa	129
WÓJCIAK B. – Udział kalmoduliny w procesach regulacji proliferacji komórek	147
HORST A. – Regulacja ekspresji genów eukaryotów	161

---

Warunki prenumeraty kwartalnika  
POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI

Prenumeratę na kraj przyjmuje redakcja ul. Marymoncka 99, 01-813 Warszawa. Pieniądze należy wysyłać na konto: Polskie Towarzystwo Anatomiczne, Bank Gdański, IV Oddział w Warszawie 300-009-6275-132. Cena prenumeraty na 1990 r. wynosi 80 000 zł. Również pojedyncze i archiwalne zeszyty można nabyć w redakcji.

*Subscription orders for POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI is through the local press distributors or directly – Editorial Board of POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI, Marymoncka str. 99, 01-813 Warszawa /Poland, account No: Polskie Towarzystwo Anatomiczne, Bank Gdański, IV Oddział w Warszawie 300-009-6275-132.*

Indeks 369705