

PL ISSN 0324-833X

POLSKIE
TOWARZYSTWO
ANATOMICZNE

POLSKIE
TOWARZYSTWO
BIOLOGII
KOMÓRKI

TOM 24 1997

Suplement nr 8

19. 3. 97

Postępy Biologii Komórki

Redaktor Zygmunt Wasylewski

**MECHANIZMY REGULACJI
EKSPRESJI GENÓW**

Część 2

Kwartalnik Polskiego Towarzystwa Anatomicznego, Polskiego Towarzystwa Biologii Komórki, Polskiej Sieci UNESCO oraz Fundacji Biologii Komórki i Biologii Molekularnej wydawany z częściową pomocą finansową Komitetu Badań Naukowych.

Quarterly of the Polish Anatomical Society, the Polish Society of Cell Biology, the Polish UNESCO Net, and the Foundation for Cell Biology and Molecular Biology, partially supported by the Committee for Scientific Research (KBN)

Redaguje Kolegium – Editors:

Szczepan BILIŃSKI (biologia rozwoju, embriologia, cytoszkielet, połączenia międzykomórkowe – *Instytut Zoologii UJ, 30-060 Kraków, ul. Ingardena 6*),

Jerzy KAWIAK (immunologia, cytometria, hematologia, biologia nowotworów – *Zakład Cytologii Klinicznej CMKP, 01-813 Warszawa, ul. Marymoncka 99*),

Wincenty KILARSKI (mięśnie, skurcz mięśniowy, ruchy komórek – *Instytut Zoologii UJ, 30-060 Kraków, ul. Ingardena 6*),

Jan MICHEJDA (szlaki informacyjne, błony komórek, energetyka komórki – *Zakład Bioenergetyki UAM, 61-701 Poznań, ul. Fredry 10*),

Maria OLSZEWSKA (komórki roślinne, informacja genetyczna w komórkach roślinnych i zwierzęcych – *Zakład Cytologii i Cytochemii Roślin Instytutu Fizjologii i Cytologii UŁ, 90-237 Łódź, ul. Banacha 12/16*),

Maciej ZABEL (histologia ogólna, endokrynologia, histochemia (immunocytochemia, hybrydocytochemia), ultrastruktura komórek – *Zakład Histologii AM, 50-368 Wrocław, ul. Chalubińskiego 6a*)

Rada Redakcyjna – Advisory Board:

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: – Editorial Office: Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego ul. Marymoncka 99, 01-813 Warszawa, Poland, tel. 340 344, fax 340470.

Recenzenci rocznika PBK są publikowani w zeszycie 4.

Referees of the volume are published in issue 4.

© Fundacja Biologii Komórki i Biologii Molekularnej – Foundation for Cell Biology and Molecular Biology

Wszystkie prawa zastrzeżone. Zabrania się kopiowania części lub całości bez uprzedniego pisemnego zezwolenia Fundacji Biologii Komórki i Biologii Molekularnej.

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced in any form or by any means without the prior written permission of the publisher. Requests to the publisher for permission should be addressed to the Fundacja Biologii Komórki i Biologii Molekularnej.

Ark. wyd. 11,0 Ark. druk. 8,0. Podpisano do druku w sierpniu 1997 r. Druk ukończono we wrześniu 1997 r.

ODDZIAŁYWANIE KWASÓW NUKLEINOWYCH Z BIAŁKAMI

PROTEIN – NUCLEIC ACIDS INTERACTION

Małgorzata GIEL-PIETRASZUK, Mirosława Z. BARCISZEWSKA,
Jan BARCISZEWSKI

Instytut Chemii Bioorganicznej, PAN, Poznań

Streszczenie: Oddziaływania białek z kwasami nukleinowymi leżą u podstaw fundamentalnych procesów zachodzących w komórkach żywych. W pracy podjęto próbę odpowiedzi na pytanie, czy istnieje "kod", wg którego następuje rozpoznawanie DNA przez białka. W tym celu scharakteryzowano wiele przykładów kompleksów białek z DNA, których struktury wyznaczono za pomocą analizy krystalograficznej i magnetycznego rezonansu jądrowego.

Słowa kluczowe: oddziaływania białko-DNA, helisa-skręt-helisa, struktura beta, palce cynkowe.

Summary: Protein - DNA interactions are involved in many of the fundamental processes inside the cells. In this paper we try to answer the question if there is any "code" according to which protein recognize DNA. For this purpose a lot of examples of protein - DNA complexes, analyzed by X-ray crystallographic techniques and the two dimensional NMR are discussed.

Key words: protein-DNA interaction, helix-turn-helix, beta-sheet, zinc finger.



1. WSTĘP

Swoiste oddziaływania białek z kwasami nukleinowymi należą do fundamentalnych procesów zachodzących w komórkach żywych, takich jak: replikacja, rekombinacja czy transkrypcja. Dla poznania wysokiej specyficzności represorów czy aktywatorów transkrypcji lub enzymów restrykcyjnych wiążących się do fragmentów DNA o długości 10–20 par zasad (pz) ze stałą asocjacji $K_D = 10^{-8}$ – 10^{-11} M niezbędne wydaje się zrozumienie molekularnych mechanizmów kierujących tymi

procesami. Analiza rentgenograficzna i magnetyczny rezonans jądrowy (NMR) pozwalają szczegółowo poznać budowę przestrzenną i oddziaływania w kompleksach białko-kwas nukleinowy. Okazało się, że swoistość rozpoznawania w tych kompleksach realizowana jest za pomocą charakterystycznych elementów struktury białek. Do najlepiej obecnie poznanych należą:

1. helisa-skręt-helisa,
2. helisa-pętla-helisa,
3. zamki leucynowe,
4. struktury β (daszkowe),
5. palce cynkowe.

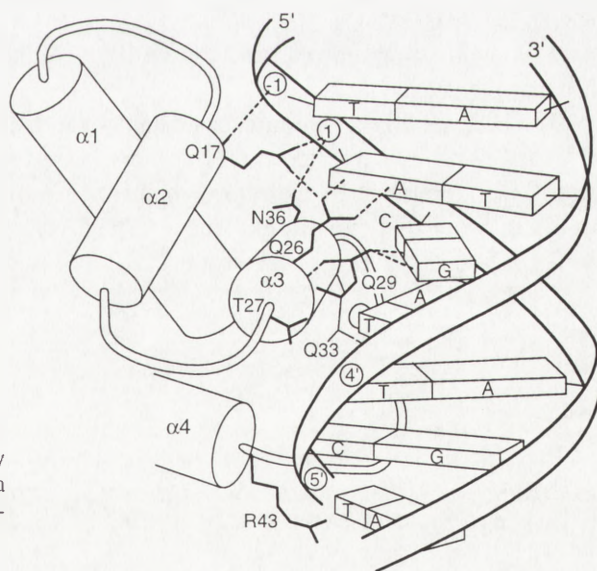
W niniejszym opracowaniu omówimy oddziaływania w kompleksach białek i kwasów nukleinowych, w których występują określone domeny strukturalne oraz zastanowimy się, czy swoiste rozpoznawanie DNA i białek można przedstawić jako kod genetyczny, czy też stanowią one odrębne przypadki.

2. HELISA-SKRĘT-HELISA

Podczas rozwiązywania struktury kryształów białek regulujących transkrypcję u prokariotów oraz odpowiadających im eukariotycznych domen homeotycznych zauważono charakterystyczne ułożenie łańcucha peptydowego. Określono je terminem helisa-skręt-helisa (ang. *helix-turn-helix*, *HTH*). Motyw ten zbudowany jest z 20 aminokwasów, które tworzą dwie helisy ułożone względem siebie pod kątem 120° [14]. Stwierdzono ponadto wiele przykładów białek np. homeodomena [38] lub represor λ [16], w których jedna z helis motywu HTH jest dłuższa o kilka aminokwasów uczestniczących w oddziaływaniach elektrostatycznych z parami zasad w dużej bruzdzie. Mechanizm rozpoznawania DNA przez białka mające w swej strukturze motyw HTH poznano po analizie kompleksu złożonego z domeny wiążącej represora faga 434 (białko faga 434 regulujące jego przejście z fazy lizogenicznej do litycznej) i DNA o długości 20 pz (R1-69/DNA) [26]. Rozmiary helisy α białka pozwalają na ułożenie jej w dużej bruzdzie DNA oraz utworzenie wiązań wodorowych pomiędzy A1 a Gln28, G2 i grupą $-\text{NH}_2$ Gln29, trzecia para zasad nie uczestniczy w wiązaniu z białkiem, ale Thr27 i Gln29 tworzą tzw. "kieszki van der Waalsa" dla tyminy. Gln33 tworzy pojedyncze wiązanie wodorowe parą 4 (AT) oraz wiązanie *van der Waalsa* z pirymidyną pary 5 [14] (rys. 1). Ponadto zaobserwowano oddziaływania pomiędzy łańcuchami bocznymi Gln17 i Asn36 a grupami fosforanowymi nukleotydów w pozycjach 1 i -1. Pętla łącząca helisy 3 i 4 białka skierowana jest w stronę szkieletu DNA, dzięki czemu powstają trzy wiązania pomiędzy grupami łańcucha głównego białka a fosforanami nukleotydów 5' i 6'. Obserwowane zwężenie małej bruzdy DNA w strukturze krystalicznej,

spowodowane jest prawdopodobnie oddziaływaniami z łańcuchem bocznym Arg43. Motyw HTH znaleziono także w represorze 434 *Cro* [48], który rozpoznaje DNA w analogiczny sposób jak R1-69. Konformacja DNA w tych kompleksach jest jednak różna, co spowodowane jest obecnością kilku dodatkowych wiązań wodorowych z grupami fosforanowymi szkieletu w 434 *Cro*/DNA. W specyficznym wiązaniu DNA przez represor λ uczestniczą: Gln44 tworząca podwójne wiązanie wodorowe z adeniną oraz Gln33, która wiąże grupę fosforanową [16] (podobna sytuacja zaobserwowana została w represorze 434 [26]). Stwierdzono, że Gln33, pomimo że nie tworzy bezpośrednio wiązania z parą zasad jest krytyczna dla rozpoznawania DNA. Jej rola polega na utrzymaniu właściwej konformacji Gln44 przez wiązania wodorowe. Oddziaływania pomiędzy aminokwasami a szkieletem cukrowo-fosforanowym prawdopodobnie umożliwiają precyzyjne usytuowanie helisy wiążącej w dużej bruzdzie DNA. W strukturze motywu HTH zauważono pewną preferencję dla aminokwasów zawierających krótkie łańcuchy boczne. Spowodowane jest to być może tym, że ich konformacja jest bardziej stabilna niż naładowane grupy Lys i Arg.

Z analizy powyższych przykładów widać, że mechanizm rozpoznawania DNA przez białka mające w swej strukturze element helisa-skret-helisa jest bardzo podobny. Wynika to z faktu, że konformacja domeny HTH jest zachowawcza. Porównanie struktury krystalicznej represora R1-69 i represora 434*Cro* wskazuje, że odchylenie pozycji atomów łańcucha głównego w motywie HTH wynosi 0,77 Å [1,26]. Natomiast różnice pomiędzy represorem λ i 434*Cro* oraz represorem λ i domeną homeotyczną wynoszą odpowiednio 1,78 Å i 0,84 Å [2,21].



Rys. 1. Schemat oddziaływań pomiędzy domeną wiążącą represora 434 (R1-69) a operatorem DNA (szczegółowy opis oddziaływań zamieszczono w tekście)

[1]

Odmiernym, odbiegającym nieco od powyższych, niezwykle ciekawym przykładem oddziaływań jest kompleks represora tryptofanowego z DNA [33]. W kompleksie tym stwierdzono bowiem wiązania wodorowe pomiędzy aminokwasami a nukleotydami za pośrednictwem wody

3. HELISA-PĘTLA-HELISA

Analiza sekwencji wielu białek odgrywających istotną rolę w kontroli rozwoju i różnicowaniu komórek u *Drosophila* i ssaków wykazała obecność zachowawczego fragmentu struktury złożonego z 60 aminokwasów, który zaangażowany jest w rozpoznawanie DNA. Domena ta składa się z zasadowego regionu przy końcu aminowym (*basic*, *b*), dwóch amfipatycznych helis połączonych pętlą (ang. *helix-loop-helix*, *HLH*) oraz zamka leucynowego (*zipper*, *z*). Do tej grupy należą m.in. białko E12, E47 ssaków oraz odpowiadające im białka będące produktem genu *daughterless* u *Drosophila*, a także MyoD, Id i Max [5,10,27,28]. Rozwiązanie struktury krystalograficznej kompleksu białka Max/DNA pozwoliło na poznanie mechanizmu rozpoznawania kwasu nukleinowego przez białka mające w swej strukturze motyw HLH [10]. Domena wiążąca białka Max zbudowana jest z 4 helis, z których jedna para oddziałuje z B-DNA w dużej bruzdzie, a druga para i zamek leucynowy (H/Z) odpowiedzialne są za tworzenie dimeru białka (rys. 2).

Oddziaływania w kompleksie Max-DNA można podzielić na 3 grupy:

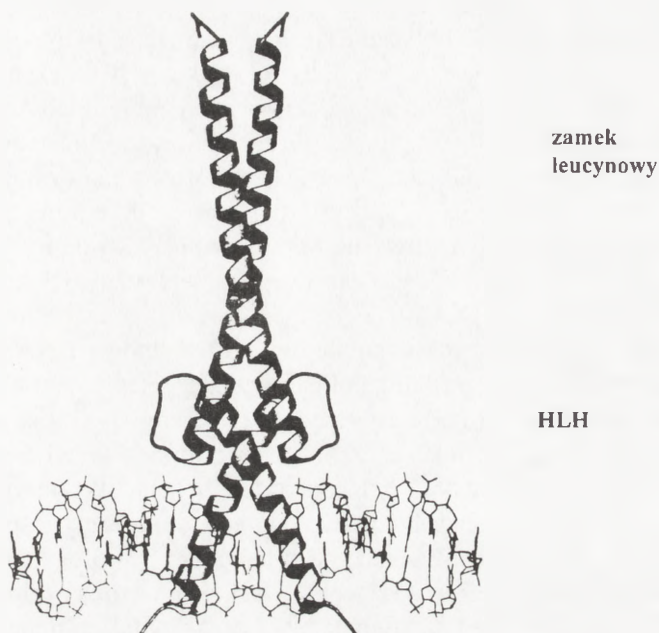
1) specyficzne wiązania pomiędzy zasadowymi aminokwasami helisy α (H1) a nukleotydami rozpoznawanej sekwencji C3A2C1G1'T2'G3' (His28-G3', Glu32-C3 i A2, Arg36-G1),

2) wiązanie pomiędzy Lys57 z pętli łączącej helisy a grupą fosforanową z małej bruzdy DNA,

3) wiązanie Arg60 znajdującej się na początku drugiej helisy z grupą fosforanową C3 i A4. Arginina w pozycji 60 odróżnia klasę białek wiążących CACGTG (Max, MyoD) od białek z hydrofobowym lub polarnym aminokwasem w tym samym miejscu, które rozpoznają sekwencję CAGTAG np. E12, E47 i białko genu *daughterless* [5].

4. HELISA α

Przedstawicielem grupy białek wiążących DNA przez helisę α jest produkt genu E2 o długości 410 aminokwasów odgrywający istotną rolę w transkrypcji i replikacji wirusa *Papilloma* (BPV – *bovine papilloma virus*). W ostatnim czasie rozwiązano



Rys. 2. Model rozpoznawania DNA przez białko Max [10]

strukturę fragmentu tego białka, obejmującego aminokwasy 326–410 w kompleksie z DNA o długości 16 pz [15]. Białko E2 wiąże się do DNA jako dimer zbudowany z antyrównoległej struktury β (po 4 nici z każdego monomeru), na powierzchni której znajdują się dwie helisy α . Podczas tworzenia kompleksu, DNA zgina się tworząc łuk o promieniu 45 Å, co umożliwia powstanie specyficznych wiązań pomiędzy aminokwasami znajdującymi się w helisie α (Asn336, Lys339, Cys340, Phe343) a zasadami w pozycjach 4, 5 i 6. Oprócz tych oddziaływań zaobserwowano dwa specyficzne wiązania z zasadami z udziałem cząsteczek wody oraz 24 z grupami fosforanowymi (10 bezpośrednich i 14 przez wodę). Tak rozległe oddziaływania nie mogą mieć miejsca bez zmiany geometrii helisy DNA. Białko E2 jest pierwszym opisanym w literaturze przykładem, gdzie powstający dimer przyjmuje strukturę beczki. Znalaziono wiele peptydów, w których dimer tworzy się w wyniku oddziaływania antyrównoległych wstęg β , np. insulina [7]. Nie tworzą one jednak opisanej wyżej struktury, jednakże podobnie jak w przypadku represora tryptofanowego [33], represora metioninowego [42] i białka CAP [41] dimeryzacja następuje przed związaniem się do DNA.

Helisa α jako element kluczowy w wiązaniu DNA, występuje także w enzymach

niespecyficznych np. polimerazie I DNA czy deoksyrybonukleazie I (DNaza I) oraz bardzo specyficznych jak enzymy restrykcyjne [11,19,43].

Analiza rentgenograficzna kryształu kompleksu DNazy I-DNA [43] wykazała, że rdzeń tego enzymu tworzy sześcioniciowa struktura β otoczona przez osiem helis α połączonych pętlami. DNaza I oddziałuje z oktamerem DNA przez wiązania wodorowe między krótką pętlą, znajdującą się w płytkiej szczelinie pomiędzy dwoma symetrycznymi fragmentami białka, a szkieletem fosforanowym DNA w małej bruzdzie. Enzym ten nie rozpoznaje specyficznej sekwencji, co tłumaczy brak wiązań z zasadami, jest natomiast wrażliwy na lokalne zmiany struktury. Obserwowane odkształcenia helisy DNA, zgięcie i rozszerzenie małej bruzdy o 5 Å, spowodowane jest związaniem białka [43].

Spośród peptydów wiążących jednoniciowy i dwuniciowy DNA niezależnie od sekwencji najlepiej poznano strukturę polimerazy I DNA (fragment Klenova) [4,11]. We fragmencie przy końcu karboksylowym tej domeny wykazującym aktywność polimerazy znajduje się głęboka szczelina, której dno stanowi 6-niciowa, antyrównoległa struktura β z dwoma helisami α po bokach. Wymiary tej szczeliny odpowiadają parametrom helisy B DNA. Podobnie zbudowany jest fragment przy końcu aminowym tejże domeny wykazujący aktywność 3'-5' egzonukleazy, różni się jednak głębokością szczeliny wiążącej DNA, której wymiary odpowiadają tylko pojedynczej nici. Wszystkie oddziaływania w tym kompleksie mają charakter niespecyficzny, zachodzą pomiędzy aminokwasami znajdującymi się w helisach a szkieletem fosforanowym.

Różnice w rozpoznawaniu DNA przez endonukleazy restrykcyjne i białka regulatorowe można scharakteryzować następująco:

1. Sekwencja DNA rozpoznawana przez enzymy restrykcyjne jest symetryczna względem osi dwukrotnej.

2. Miejsce rozpoznawane złożone jest z 4–8 par zasad, podczas gdy represory zwykle rozpoznają dłuższe sekwencje 14–20 pz.

3. Enzymy restrykcyjne wykazują znacznie wyższą specyficzność (zamiana jednego nukleotydu w sekwencji DNA całkowicie znosi zdolność wiązania białka).

Endonukleaza EcoRI, wiążąca się do DNA jako dimer zbudowana jest z pięcionicionej struktury β otoczonej, podobnie jak w powyższych przykładach, przez helisy α [19]. DNA w tym kompleksie przyjmuje formę zniekształconej helisy B z 3 miejscami zgięcia. Przegięciu o 25° w centralnym miejscu towarzyszy rozplecenie DNA i poszerzenie dużej bruzdy. Miejsce aktywne enzymu znajduje się przy końcu karboksylowym równoległej struktury β i tworzy szczelinę, helisy natomiast skierowane są w stronę DNA, co umożliwiła łańcuchom bocznym argininy i kwasu glutaminowego penetrację dużej bruzdy w celu utworzenia wiązań.

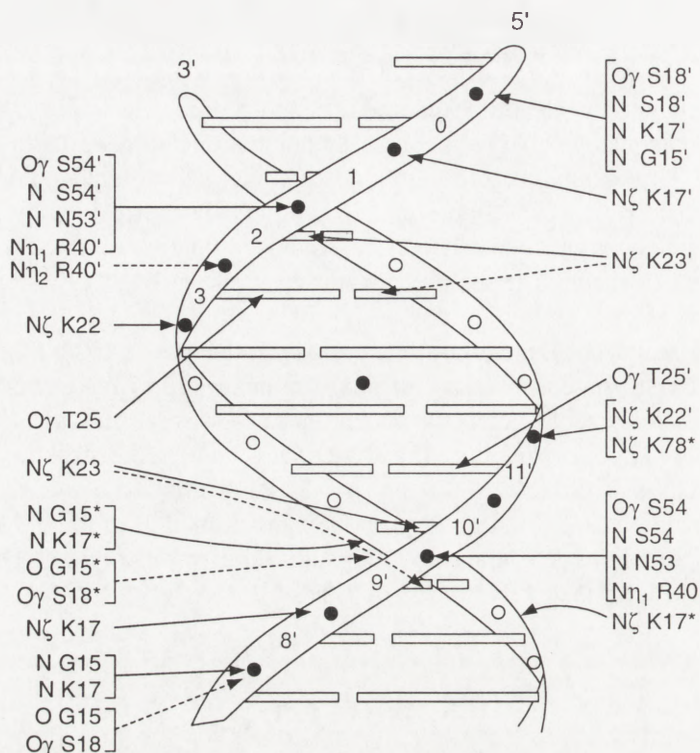
5. ZAMEK LEUCYNOWY

Zamek leucynowy nie jest elementem bezpośrednio wiążącym DNA, jest natomiast zaangażowany w tworzenie dimeru białka. Znalezione zostały m. in. w białku GAL-4 [25]. Utworzenie dimeru następuje za pomocą dwóch helis ułożonych równolegle i skręconych wokół siebie tak, że powstaje 1/4 lewoskrętnej helisy. Skok takiej superhelisy wynosi ok. 181 Å, a średnia odległość pomiędzy ich osiami 9,3 Å. Helisa α każdego monomeru zbudowana jest z 4 lub 5 następujących po sobie bloków złożonych z 7 aminokwasów. W każdym z takich bloków w pozycji 1 występuje aminokwas niepolarny, a w pozycji 4 leucyna [32]. Stąd też zamek leucynowy często przedstawiany jest jako drabinka, której boki tworzą łańcuchy główne helis, a szczeble łańcuchy boczne aminokwasów, głównie leucyny [22]. Białka GCN4 [47] oraz *fos* i *jun* [35] zawierające ten element struktury rozpoznają miejsca w DNA o długości 9–10 pz, a oddziaływania mają miejsce wyłącznie w dużej bruzdzie [13,29,30,46]. W proponowanych modelach kompleksów, helisy tworzące superhelisę rozdzielają się i ulegają insercji w dużą bruzdę DNA tworząc strukturę określaną jako "scissors grip" [31,46].

6. WSTĘGA β

Istnieją dwie klasy prokariotycznych białek oddziałujących z DNA przez element rozpoznający nazywany strukturą β [12]. Do pierwszej klasy należą represor metioninowy z *E. coli* (*metJ*) [39] i Arc [6]. Przedstawicielem drugiej jest białko HU [44] tworzące skondensowane jądrowe struktury u wielu prokariotów np. IHF (*integration host factor*) w *E. coli* i fagowy czynnik transkrypcyjny 1 (TF1) w *B. subtilis*. Struktura *metJ* została określona rentgenograficznie [39], a struktura Arc za pomocą NMR [6]. Białka te są dimerami, których rdzeń złożony jest z 4 helis α po dwie z każdej podjednostki, zawiera dodatkową helisę przy końcu karboksylowym. Antyrównoległa wstęga β skierowana jest na zewnątrz rdzenia i zbudowana jest z aminokwasów pochodzących z segmentów przy końcu aminowym obu monomerów tworzących dimer. Badania krystalograficzne kompleksu *met* represor-operator wykazały, że wstęga β leży w dużej bruzdzie DNA [42]. Bezpośrednie oddziaływania represora *met* z DNA pochodzą z trzech regionów białka (rys. 3):

1. Pierwszy obszar obejmuje oddziaływania pomiędzy łańcuchami bocznymi aminokwasów tworzących strukturę β a zasadami w dużej bruzdzie DNA. Grupy hydroksylowe Thr 25 i Thr 25' tworzą wiązanie wodorowe z A3 i A11', natomiast łańcuchy boczne Lys23 i Lys23' z G10' i G2. Obie lizyny tworzą również wiązanie z udziałem cząsteczki wody z A9 i T14' z sąsiedniej pary zasad.



Rys. 3. Schemat oddziaływań w kompleksie represora metioninowego z DNA: czarnym kwadratem oznaczono dwukrotną oś symetrii, pozycje fosforanów zaznaczono za pomocą kótek, strzałkami wskazano bezpośrednie wiązania pomiędzy aminokwasami a zasadami lub resztami fosforanowymi, natomiast linią przerywaną wiązania z resztami fosforanowymi na powierzchni DNA [42]

2. Drugim obszarem oddziaływania jest N-końcowy odcinek helisy α . Wiązania pomiędzy aminokwasami a grupami fosforanowymi w tym fragmencie są podobne do występujących w kompleksach represorów z DNA [1,16].

3. Trzeci region to giętka pętla obejmująca pozycje 12–20. Grupy amidowe łańcucha głównego Gly15 i Lys17 tworzą bezpośrednie wiązania z resztą fosforanową T8', a grupa hydroksylowa łańcucha bocznego seryny 18 tworzy wiązanie poprzez cząsteczkę wody. DNA w tym kompleksie występuje w formie B, dziesięć centralnych par zasad tworzy prostą helisę zgiętą na końcach tego regionu o ok. 25° w kierunku dużej bruzdy.

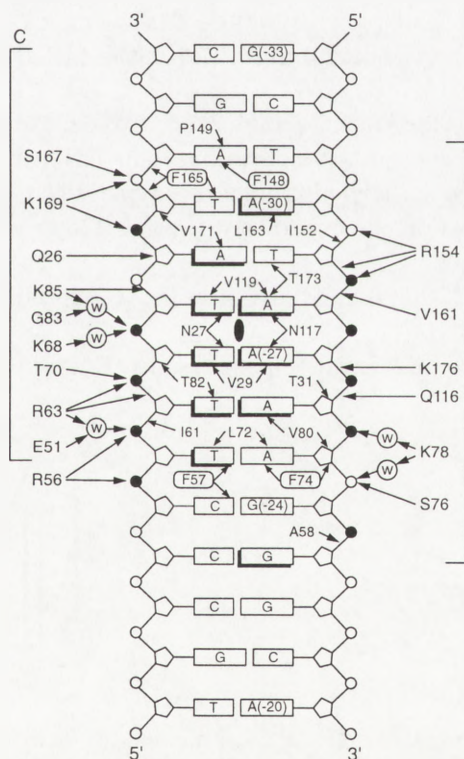
Do tej grupy białek należy również białko wiążące element TATA (ang. *TATA binding protein, TATA-TBP*) z *Arabidopsis thaliana*. Rozwiązanie jego struktury w kompleksie z DNA rozszerzyło dotychczasową wiedzę o procesie rozpoznawania, a także inicjacji transkrypcji [18,20]. Białko TBP zbudowane jest z dwóch symetrycznych domen, przypominających siodło, którego wklęsła część zbudowana

jest ze zgiętych, antyrównoległych struktur β stanowiących miejsce wiązania DNA. Powierzchnia wypukła TBP stanowi prawdopodobnie miejsce wiązania innych składników kompleksu transkrypcyjnego. Fragment DNA o sekwencji TATAAAAG, poza obszarem wiązania zachowuje formę B-DNA (11,3 pz/skręt), natomiast w miejscu wiązania do TBP ulega zgięciu o ok. 100° pomiędzy parami TA i AG, co umożliwia utworzenie wielu rozwidlonych wiązań wodorowych. Wspomniane wyżej zgięcie prowadzi do rozszerzenia małej bruzdy z 7,4 do 9,9 Å.

TBP podczas wiązania z DNA ulega nieznacznym zmianom konformacyjnym. Oddziaływania w kompleksie TBP2-DNA zasadniczo ograniczone są do wiązań ze szkieletem cukrowo-fosforanowym w małej bruzdzie. Oddziaływania w omawianym kompleksie można podzielić na 3 grupy (rys. 4):

1) Łańcuchy boczne fenyloalaniny interkalują częściowo pomiędzy pary zasad AT indukując zgięcie helisy DNA. Natomiast pomiędzy Phe57-Phe74 i Phe148-Phe165 zachodzą oddziaływania typu *van der Waals*.

2) Oddziaływania pomiędzy polarnymi łańcuchami bocznymi aminokwasów Asn i Thr a 4 parami zasad: Asn27 - T28 i T27, Asn117 - A27 i A28, Thr82 - T26, Thr173 - T29.



Rys. 4. Zestawienie oddziaływań w kompleksie białka wiążącego sekwencję TATA z DNA [20]: strzałkami wskazano wiązania wodorowe pomiędzy aminokwasami a nukleotydamy

3) Pomiędzy aminokwasami znajdującymi się na wklęsłej powierzchni TBP a 8 parami zasad zachodzą oddziaływania typu hydrofobowego i *van der Waalsa*.

Deformację helisy DNA oraz zmiany konformacji białka zachodzące podczas wiązania zauważono także w innych kompleksach. Brak jednak satysfakcjonującego wytłumaczenia tego zjawiska. W przypadku TBP zakłada się współzawodnictwo o DNA pomiędzy tym białkiem a nukleosomem. Zgięcie DNA przez TBP w stronę odwrotną niż preferowana przez histony powoduje zaburzenia lokalnej struktury chromatyny i udostępnienie miejsca wiązania dla kompleksu transkrypcyjnego.

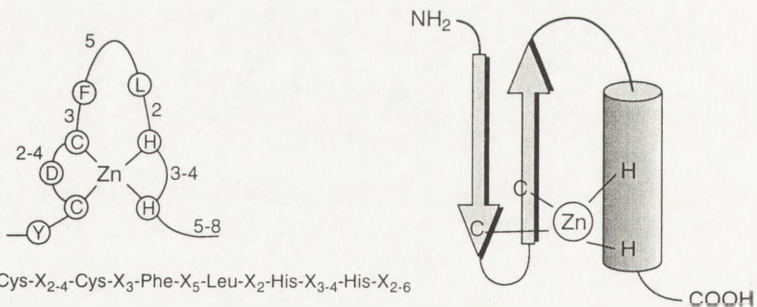
7. PALCE CYNKOWE

Kolejnym elementem struktury białek, za pośrednictwem którego następuje oddziaływanie z DNA, są domeny określane jako "palce cynkowe". Elementy te zidentyfikowano po raz pierwszy w czynniku transkrypcyjnym IIIA z *Xenopus laevis*. Pojedyncza domena cynkowa typu C_2H_2 , występująca w TFIIIA, złożona jest z 30 aminokwasów tworzących helisę α , w której skład wchodzi reszty histydyny (H), połączonej pętlą z dwuniciową strukturą β zawierającą cysteiny (C) (rys. 5). Liczba palców cynkowych w białku może się wahać od 1 do 37 [3,40] w TFIIIA jest ich dziewięć.

Najlepiej poznanym przykładem specyficznego rozpoznawania DNA przez białka zawierające palce cynkowe jest struktura kryształu DNA (5')GCGTGGGCG(3') i trzech palców cynkowych czynnika transkrypcyjnego Zif268 z myszy (Zif268-DNA) [36]. Pojedynczą domenę cynkową peptydu Zif268 można w skrócie przedstawić następująco:

X-(Thr,Phe)-X-Cys-X₂-Cys-X₃-Phe-X-Arg(13)-X-Asp-Glu/His(16)-Leu-X-A Arg/Thr(19)-His-X₃-His.

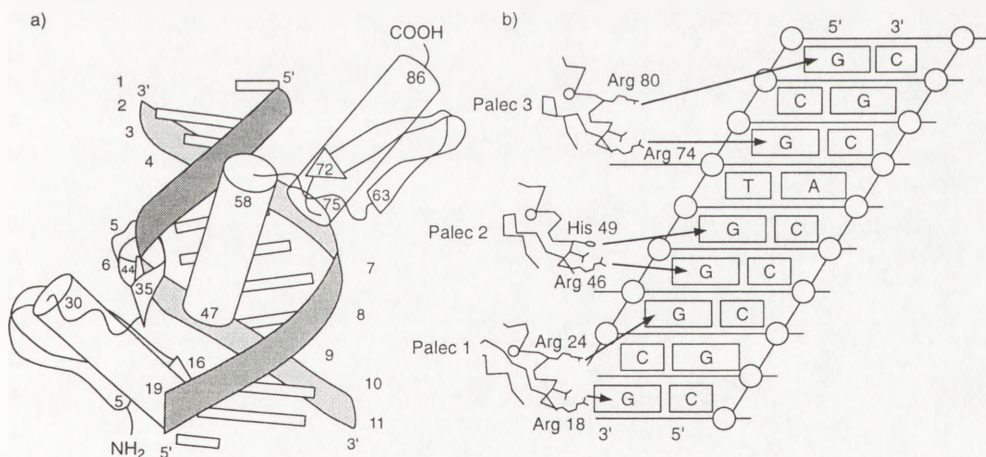
Każdy palec cynkowy rozpoznaje 3 pary zasad w DNA. Aminokwas znajdujący



Rys. 5. Schemat palca cynkowego typu TFIIIA, helisę α przedstawiono za pomocą cylindra, strzałki oznaczają strukturę β

się bezpośrednio przed helisą α (od końca aminowego) oraz aminokwasy drugi, trzeci i szósty tworzące helisę wydają się być kluczowe dla oddziaływania z DNA.

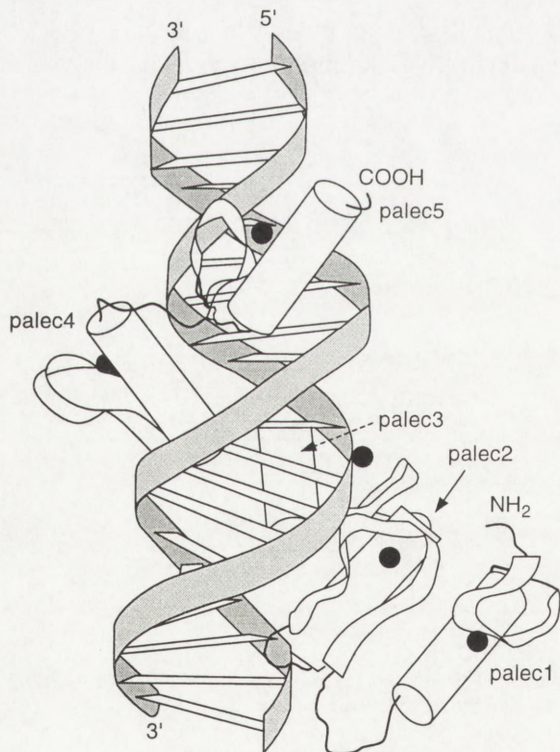
W strukturze krystalicznej kompleksu Zif268-DNA stwierdzono 11 wiązań wodorowych z tego 6 między aminokwasami a zasadami znajdującymi się w dużej bruzdzie pozostałe z resztami fosforanowymi (rys. 6a,b). W pozycjach 13, 16 i 19 każdej domeny znajdują się aminokwasy biorące udział w wiązaniu. Palce pierwszy i trzeci zawierają w tych pozycjach Arg, Glu i Arg, podczas gdy drugi palec Arg, His i Thr. Na rysunku zaznaczono wiązania pomiędzy Arg18(P1), Arg46(P2), i Arg74(P3) a rozpoznawanymi przez nie resztami guanozynowymi w pozycjach odpowiednio 10, 7 i 4 oraz Arg24(P1) i Arg80(P3) a G8 i G2 a His49 z G6. Kwas asparaginowy w pozycji 20, 48 i 76 nie oddziałuje z DNA, ale tworzy wiązania z łańcuchami bocznymi arginin. Białko glioblastoma (GLI) mające 5 palców cynkowych rozpoznaje DNA za pośrednictwem czterech, z których tylko 4 i 5 tworzą wiązania z zasadami w dużej bruzdzie (Lys150-G, Ser147-A, Asp144-C, Ser146-G, Arg149-G, Asp116-C, Lys119-G, Ser115-G/T, Ala114-T). Palce 2 i 3 oddziałują z resztami fosforanowymi. Palec 1 natomiast nie oddziałuje z helisą DNA, ale tworzy wiązania z palcem 2 stabilizując jego konformację [37] (rys. 7). Palce 4 i 5 także tworzą wiązania ze szkieletem. Jak zatem widać, w sposobie rozpoznawania DNA przez białka Zif268 i GLI istnieją pewne podobieństwa (białko oplata DNA wzdłuż dużej bruzdy), w szczegółach jednak dają się zauważyć dość istotne różnice. Parametry struktury DNA w tym kompleksie, poza obszarem wiązania 15–21 pz nie odbiegają od charakterystycznych dla formy B. Zaobserwowano tylko nieznaczne



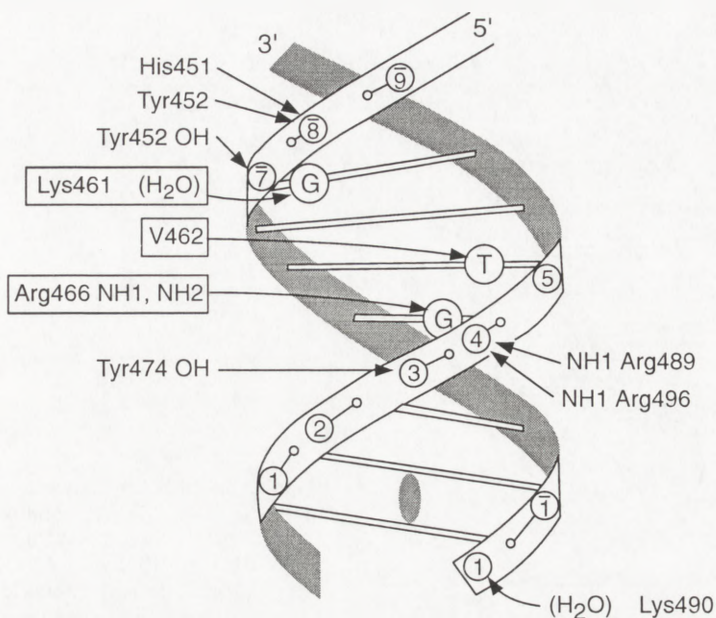
Rys. 6. a – Struktura przestrzenna kompleksu Zif268-DNA, polipeptyd zawierający palce cynkowe ułożone wzdłuż dużej bruzdy DNA; b – Schemat oddziaływań poszczególnych palców cynkowych Zif268 z zasadami w dużej bruzdzie DNA [36]

przemieszczenie położenia zasad i pogłębienie dużej bruzdy. Region obejmujący nukleotydy 7–15, a zatem zaangażowany w wiązanie wykazuje strukturę pośrednią pomiędzy formą A i B, gdzie duża bruzda jest głęboka, a mała poszerzona. Natomiast region obejmujący zasady 2–7 przyjmuje formę C-DNA. Duża bruzda jest płytka, a średnica DNA mała [37]. Struktura palców w GLI jest bardzo podobna do obserwowanej w Zif268. Nieznaczące różnice dotyczą tylko odległości między histydynami, która wynosi 3 aminokwasy dla palców 2 i 3 oraz 4 dla palców 1, 4 i 5. Palec 1 nie biorący udziału w rozpoznawaniu DNA tworzy wiązania typu białko-białko z palcem 2 (rys. 7). Konformacje sekwencji łączących poszczególne palce w GLI również nie odbiegają od analogicznych w Zif268. Z powyższych rozważań wynika, że w kompleksie Zif268-DNA każdy z palców wnosi taki sam wkład do wiązania, podczas gdy w GLI-DNA palce pozostają nierównocenne.

Budowa przestrzenna tego palca należącego do klasy C_2C_2 wyznaczona została za pomocą NMR [23]. Każda domena tego typu zawiera po dwa elementy złożone z pętli i helisy. Jon cynku związany jest przez dwie cysteiny znajdujące się na początku pętli i dwie następne znajdujące się w helisie α . Obie helisy w domenie ułożone są na przeciw siebie pod kątem prostym, a ich konformacje różnią się tylko nieznacznie. Całkowitą strukturę domeny wiążącej można przedstawić jako powtórzenie motywu pętla-helisa. Dla określenia budowy tego palca zaproponowano



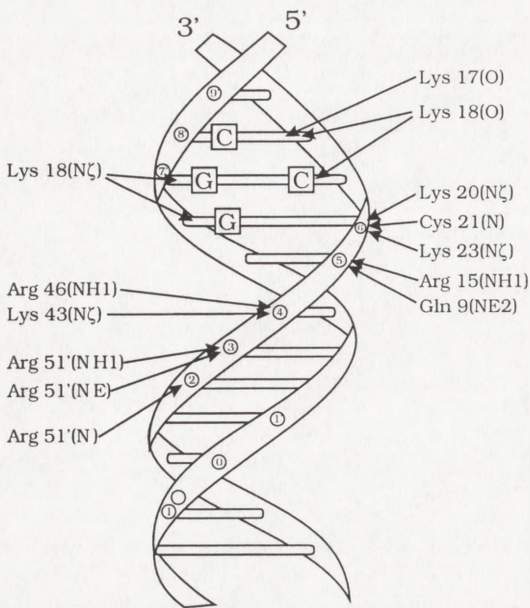
Rys. 7. Schemat oddziaływania poszczególnych palców cynkowych GLI z DNA [37]



Rys. 8. Oddziaływania w kompleksie receptora glukokortykoidowego z DNA: strzałkami zaznaczono wiązania między aminokwasami a zasadami i resztami fosforanowymi DNA, symbolem czarnym zaznaczono dwukrotną oś symetrii dimeru [23]

nawet nazwę pętla-Zn-helisa (L-Zn-H) [23]. Białka zawierające domeny pętla-cynk-helisa wiążą się do DNA jako dimery, a o specyficzności wiązania decydują reszty aminokwasowe znajdujące się blisko końca aminowego pierwszej helisy (rys. 8) [9,24,45], natomiast w tworzeniu dimeru uczestniczą aminokwasy znajdujące się na początku drugiej pętli. Helisa α receptora glukokortykoidowego w kompleksie z operatorem leży w dużej bruzdzie DNA, a łańcuchy boczne z jej drugiego i trzeciego skrętu oddziałują z zasadami DNA (rys. 8) [23].

Palce cynkowe klasy $C_2C_2C_2$ stwierdzono w aktywatorach transkrypcji, z których najlepiej poznany został GAL-4 (aktywator transkrypcji drożdży) [25,34]. GAL-4 wiąże się jako dimer do DNA o długości 17 par zasad mającego symetrię dwukrotną. Domena wiążąca znajduje się przy N-końcu łańcucha białkowego, a w rozpoznawaniu biorą udział aminokwasy 1–74. Analiza danych NMR wykazała, że każdy jon cynku wiązany jest przez 4 cysteiny [34]. W tworzeniu dimeru udział biorą aminokwasy w pozycjach 65–100 tworzące helisę α [8]. Helisy pochodzące z dwóch monomerów usytuowane są równolegle względem siebie i oddziałują przez zamek leucynowy szczegółowo opisany wcześniej. W kompleksie element odpowiadający za dimeryzację, zamek leucynowy, usytuowany jest nad małą bruzdą DNA prostopadle do jego osi. Fragment łańcucha białkowego łączący element rozpoznający z zamkiem leucynowym, zawierający aminokwasy od 41 do 49 jest ułożony równolegle do



Rys. 9. Schemat oddziaływań w kompleksie białka GAL-4 z DNA: aminokwasy Arg46, Lys43, Arg51 wchodzi w skład zamka leucynowego, Gln9, Arg15, Lys23, Cys21, Lys20 tworzą "łącznik" między zamkiem a palcem cynkowym, Lys17 i Lys18 należą do domeny palca cynkowego [25]

szkieletu fosforanowego helisy DNA i tworzy wiązanie pomiędzy dodatnio naładowanymi resztami Lys43 i Arg46 a fosforanami w pozycji 4 oraz Arg51 z resztami fosforanowymi w poz. 2 i 3. Natomiast element zawierający palce cynkowe oddziałuje przez lizyny 17 i 18 z zasadami w dużej bruzdzie. Struktura DNA w tym kompleksie różni się tylko nieznacznie od standardowej formy B (rys. 9).

8. UWAGI KOŃCOWE

Z przedstawionej powyżej charakterystyki sposobu rozpoznawania kwasów nukleinowych przez białka wynika, że proces ten najczęściej przebiega w drodze insercji helisy w dużą bruzdę DNA. Utworzenie specyficznych wiązań następuje wskutek oddziaływania łańcuchów bocznych aminokwasów z dostępnymi grupami funkcyjnymi zasad. Wiązania wodorowe ze szkieletem fosforanowym stabilizujące kompleks są jednocześnie wrażliwe na konformację DNA, która z kolei uzależniona jest od sekwencji. Wiązanie białka powoduje czasami odkształcenie helisy DNA (tab. 1). Ciekawe jest jednak to, że białka, które mocno deformują helisę DNA, np. CAP (*catabolite activator protein*) nie tworzą rozległych oddziaływań wykraczających poza element wiążący, a te które słabo odkształcają, np. homeodomeny tworzą bardziej rozległą siatkę wiązań. Z analizy przykładów zestawionych w tabeli

TABELA 1. Zmiany konformacji DNA w kompleksach z białkami

Kompleks	Białko	DNA	Miejsce oddział. z DNA
λ CI represor	–	–	duża bruzda
λ cro represor	rot. podjednost.	40° skręt	duża bruzda
P434 represor	–	kompresja m.b.	duża bruzda
P434 <i>cro</i> rep.	–	–	duża bruzda
<i>trp</i> represor	rot. mot. HTH	60° skręt rozszerzenie małej bruzdy	duża bruzda
<i>lac</i> represor	rot. spirali	–	duża bruzda
CAP	?	skręt 90°(2 × 45°)	duża bruzda
<i>ant</i> homeod.	+	–	duża bruzda, ramię w m.b
<i>eng</i> homeod.	nie wyzn.	+	duża bruzda, ramię w m.b
<i>met</i> represor	–	25° skręt, kompres. d.b.	duża bruzda
E2		45°	duża bruzda
Arc represor		3× zgięcie DNA=50°, zwężenie d.b	duża bruzda
TBP	+	rozszerzenie m.b.	
		2× zgięcie DNA=100° rozszerzenie m.b	mała bruzda
DNase I	–	rozszerz. m.b.	mała bruzda
EcoRI	–	3 skręt. rozszerz. dużej bruzdy	duża bruzda
EcoRV	+	+	duża bruzda

+ zmiana konformacji, – konformacja bez zmian, m.b. – mała bruzda, d.b. – duża bruzda

I wynika, że budowanie modelu oddziaływań na podstawie struktury jednego tylko składnika kompleksu może prowadzić do niepewnych wniosków, ponieważ struktura ich może ulegać zmianom, co jest szczególnie widoczne właśnie w konformacji DNA. Odształcenie helisy DNA uniemożliwia lub utrudnia wiązanie innych białek, a tym samym aktywację lub represję. W celu uzyskania pełnej charakterystyki sposobu rozpoznawania białko DNA konieczne jest porównanie oddziaływań specyficznych jak również i niespecyficznych. Błędne może także okazać się założenie, że mutacje punktowe powodują tylko lokalne zmiany konformacji, np. zamiana Glu19 na Lys w *trp* represorze zwiększa powinowactwo do operatora, pomimo [17] że znajduje się w znacznej odległości od miejsca wiązania [33]. Jak dotąd rozwiązano struktury wielu kompleksów białek z DNA (tab. 2), ciągle jednak jest

Tabela 2. Elementy strukturalne białek wiążących DNA

Klasa	Białko	Sekwencja operatora	Literatura
Helisa-skreęt-helisa	λ CI	TATATCACCAGTGGTAT TATAGTGGTCACCATAA	16
	λ cro	TATCACC GCGGGTGATA ATAGTGGCGCCCCTAT*	12
	P434	ACAATATATATTGT TGTTATATATAACA	26
	P434cro	ACAATATATATTGT TGTTATATATAACA	48
	<i>trp</i>	TGTACTAGTTAACTAGTC CATGATCAATTGATCAGT	33
	CAP	GCGAAAAGTGTGACATT GCTTTTCACACTG	41
	<i>eng</i>	TTTTGCCATGTAATTACCTAA AACGGTACATTAATGGATTA	21
Helisa-pętla-helisa	Max	CACGTG GAGCAC	10
Palec cynkowy, C ₂ -H ₂	Zif268		36
	GLI	CGTGGACCACCCAAGACGAA GCACCTGGTGGGTTCTGCTT	37
Palec cynkowy, C ₂ -C ₂	<i>glc</i>	AGAACAXXTGTTCT TCTTGTXXXACAAGA	23
Palec cynkowy, C ₂ C ₂ C ₂	GAL-4	CGGAGGACTGTCCTCCCG GCCTCCTGACAGGAGGGC	25
Zamek leucynowy	<i>fos</i> , <i>jun</i>	–	35
	GCN4	–	32
Wstęga β	<i>arc</i>	ATAGTAGAGTGCTTCTATCAT TATCATCTCACGAAGATAGTA	6
	<i>metJ</i>	TTAGACGTCTAGACGTCTA ATCTGCAGATCTGCAGATT	39
	TBP	TATAAAAG ATATTTTC	18
	Inne	<i>EcoRI</i>	TCGCGAATTCGCG GCGCTTAAGCGCT
	<i>EcoRV</i>	GGGATATCCC CCCTATAGGG	19
	DNAase I	AGACCGCCCGG GGCGGGCC	43

to zbyt mała liczba dla zrozumienia istoty mechanizmu rozpoznawania. Na podstawie danych, jakimi obecnie dysponujemy, można wyciągnąć wniosek, że nie ma uniwersalnego systemu rozpoznawania DNA przez białka, pomimo ewidentnych podobieństw w sposobie wiązania, jak w przypadku HTH, każdy przypadek powinien być jednak rozpatrywany indywidualnie.

LITERATURA

- [1] AGGARWAL AK, RODGERS DW, DROTTAR M, PTASHNE M, HARRISON SC. Recognition of a DNA operator by the repressor of the phage 434: a view at high resolution. *Science* 1988; **242**: 899–907.
- [2] ANDERSON WF, OHLENDORF DM, TAKEDA Y, MATTHEWS BW. Structure of the cro repressor from bacteriophage lambda and its interaction with DNA. *Nature* 1981; **290**: 754–758.
- [3] BALDARELLI RM, MAHONEY PA, SALAS F, GUSTAVSON E, BOYER PD, CHANG R.-F, ROARK M, LENGYEL JA. Transcripts of the *Drosophila* blastoderm-specific locus, terminus are concentrated posteriorly and encode a potential DNA-binding finger. *Dev Biol* 1988; **135**: 85–95.
- [4] BEESE LS, STEITZ TA. Structural basis for the 3'-5' exonuclease activity of *Escherichia coli* DNA polymerase I: a two metal ion mechanism. *EMBO J* 1991; **10**: 25–33.
- [5] BENEZRA R, DAVIS RL, LOCKSHON D, TURNER DL, WEINTRAUB H. The protein Id: a negative regulator of helix-loop-helix DNA binding proteins. *Cell* 1990; **61**: 49–59.
- [6] BERG JN VAN OPHEUSDEN JHJ, BURGERING MJM, BOELENS R, KAPTEIN R. Structure of Arc repressor in solution: evidence for family of β -sheet DNA-binding proteins. *Nature* 1990; **346**: 586–589.
- [7] BLUNDELL TL, CUTFIELD JF, CUTFIELD SM, DODSON EJ, DODSON GG, HODGKIN DC, MERCOLA DA, VIJAYAN M. Atomic positions in rhombohedral zinc insulin crystals. *Nature* 1971; **231**: 506.
- [8] CAREY M, KAKIDANI H, LEATHERWOOD J, MOSTASHARI F, PTASHNE M. An amino-terminal fragment of GAL-4 binds DNA as a dimer. *J Mol Biol* 1989; **209**: 423–432.
- [9] DANIELSON M, HINCK L, RINGOLD GM. Two amino acids within the knuckle of the first zinc finger specify DNA response activation by the glucocorticoid receptor. *Cell* 1987; **57**: 1131–1138.
- [10] FERRE-D-AMARE A, PRENDERGAST GC, ZIFF EB, BURLEY SK. Recognition by Max of its cognate DNA through a dimeric b/HLH/Z domain. *Nature* 1993; **363**: 38–45.
- [11] FREEMONT PS, FRIEDMAN JM, BEESE L, SANDERSON MR, STEITZ TA. Cocystal structure of an editing complex of Klenov fragment with DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; **85**: 8924–8928.
- [12] FREEMONT PS, LANE AN, SANDERSON MR. Structural aspects of protein-DNA recognition. *Biochem J* 1991; **278**: 1–23.
- [13] GARTENBERG MR, AMPE CH, STEITZ TA, CROTHERS DM. Molecular characterization of the GCN4-DNA complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; **87**: 6034–6038.
- [14] HARRISON SCA, AGGARWAL AK. DNA recognition by proteins with the helix-turn-helix motif. *Ann Rev Biochem* 1990; **59**: 933–969.
- [15] HEGDE RS, GROSSMAN SR, LAIMINS LA, SIGLER PB. Crystal structure at 1.7 Å of the bovine papillomavirus-1 E2 DNA-binding domain bound to its DNA target. *Nature* 1992; **359**: 505–512.
- [16] JORDAN SR, PABO CE. Structure of the lambda complex at 2.5 Å resolution: details of the repressor-operator interactions. *Science* 1988; **242**: 893–899.
- [17] KELLEY RL, YANOFSKY C. Trp aporepressor production is controlled by autogenous regulation and inefficient translation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982; **79**: 3120–3124.
- [18] KIM Y, GEIGER JH, HAHN S, SIGLER PB. Crystal structure of a yeast TBP/TATA-box complex. *Nature* 1993; **365**: 512–520.
- [19] KIM Y, GRABLE JC, LOVE R, GREENE PJ, ROSENBERG JM. Refinement of Eco RI endonuclease crystal structure: a revised protein chain tracing. *Science* 1990; **249**: 1307–1309.
- [20] KIM JL, NIKOLOV DB, BURLEY SK. Co-crystal structure of TBP recognizing the minor groove of TATA element. *Nature* 1993; **365**: 520–527

- [21] KISSINGER CR, LIU B, MARTIN-BLANCO E, KORNBERG TB, PABO CO. Crystal structure of an engrailed homeodomain-DNA complex at 2.8 Å resolution: a framework for understanding homeodomain-DNA interactions. *Cell* 1990; **63**: 579–590.
- [22] LANDSCHULZ WH, JOHNSON PF, McKNIGHT SL The leucine zipper: a hypothetical structure common to a new class of DNA binding protein. *Science* 1988; **240**: 1759.
- [23] LUISI BF, XU WX, OTWINOWSKI Z, FREEDMAN LP, YAMAMOTO KR, SIGLER PB Crystallographic analysis of the interaction of glucocorticoid receptor with DNA. *Nature* 1991; **52**: 497–505
- [24] MADER S, KUMAR V, DEVERNEUIL H, CHAMBON P. Three amino acids of the oestrogen receptor are essential to its ability to distinguish an oestrogen from glucocorticoid responsive element. *Nature* 1989; **338**: 271–274.
- [25] MARMORSTEIN R, CAREY M, PTASHNE M, HARRISON SC. DNA recognition by GAL4: structure of a protein-DNA complex. *Nature* 1992; **356**: 408–414.
- [26] MONDRAGON A, SUBBIAH S, ALMO SC, DROTTAR M, HARRISON SC. Structure of the amino terminal domain of the phage 434 repressor at 2.0 Å resolution. *J Mol Biol* 1989; **205**: 189–200.
- [27] MURRE C, McCAW PS, BALTIMORE D. A new DNA binding and dimerisation motif in immunoglobulin enhancer binding, *daughterless*, *MyoD*, and *myc* proteins. *Cell* 1989; **56**: 777–783.
- [28] MURRE C, McCAW PS, VAESSIN H, CAUDY M, JAN LY, JAN YN, CABRERA CV, BUSKIN JN, HAUSCHKA SD, LASSAR AB, WEINTRAUB H, BALTIMORE D. Interactions between heterologous helix-loop-helix proteins generate complexes that bind specifically to a common DNA sequence. *Cell* 1989; **58**: 537–544.
- [29] NYE JA, GRAVES BJ. Alkylation interference identifies essential DNA contacts for sequence-specific binding of the eukaryotic transcription factor C/EBP. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; **87**: 3992–3996.
- [30] OAKLEY MG, DARVAN PB. Structural motif of the GCN4 DNA binding domain characterised by affinity cleaving. *Science* 1990; **248**: 847–851.
- [31] O'NEIL KT, HOESS RH, DEGRADO WF. Design of DNA-binding peptides based on the leucine zipper motif. *Science* 1990; **249**: 774–778.
- [32] O'SHEA EK, KLEMM JD, KIM PS, ALBER T. X-ray structure of the GCN4 leucine zipper, a two-stranded, parallel coiled coil. *Science* 1991; **254**: 539–544.
- [33] OTWINOWSKI Z, SCHEVITZ RV, ZHANG RG, LAWSON CL, JOACHIMIAK A, MARMORSTEIN RQ, LUISI BF, SIGLER PB. Crystal structure of *trp* repressor-operator complex at atomic resolution. *Nature (London)* 1988; **335**: 321–329.
- [34] PAN T, COLEMAN JE. GAL4 transcription factor is not a "zinc finger" but forms a Zn(II)₂Cys₆ binuclear cluster. *Proc Nat Acad Sci USA* 1990; **87**: 2077–2081.
- [35] PATEL L, ABATE C, CURRAN T. Altered protein conformation on DNA binding by Fos and Jun. *Nature* 1990; **347**: 572–578.
- [36] PAVLETICH NP, PABO CO. Zinc finger-DNA recognition: crystal structure of a Zif268-DNA complex at 2.1 Å. *Science* 1991; **252**: 809–817.
- [37] PAVLETICH NP, PABO CO. Crystal structure of a five-finger GLI-DNA complex: new perspectives on zinc fingers. *Science* 1993; **261**: 1701–1707.
- [38] QIAN YQ, BILLETTER M, OTTING G, NULLER M, GEHRING WJ, WUTHRICH K. The structure of the Antennapedia Homeodomain determined by NMR spectroscopy in solution: comparison with prokaryotic repressors. *Cell* 1989; **59**: 573–580.
- [39] RAFFERTY JB, SOMERS WS, SAINT-GIRONS I, PHILLIPS SEV. Three dimensional crystal structures of *Escherichia coli* met repressor with and without corepressor. *Nature* 1989; **341**: 705–710.
- [40] RUIZ I ALTABA A, PERRY-O'KEEFE H, MELTON A. Xfin: an embryonic gene encoding a multifingered protein in *Xenopus*. *EMBO J* 1987; **6**: 3065–3070.

- [41] SCHULTZ SC, SHIELDS GC, STEITZ TA. Crystal structure of a CAP-DNA complex: the DNA is bent by 90°. *Science* 1991; **253**: 1001–1007.
- [42] SOMERS WS, PHILIPS SEV. Crystal structure of the met repressor-operator complex at 2.8 Å resolution reveals DNA recognition by β -strands. *Nature* 1992; **359**: 387–393.
- [43] SUCK D, LAHM A, OEFNER C. Structure refined to 2 Å of a nicked DNA octanucleotide complex with DNase I. *Nature* ? **332**: 464–468.
- [44] TANAKA I, APPELT K, DIJK J, WHITE SW, WILSON KS. 3 Å resolution structure of a protein with histone like properties in prokaryotes. *Nature* 1984; **310**: 376–381.
- [45] UMESONO K, EVANS RM. Determinants of target gene specificity for steroid/thyroid hormone receptors. *Cell* 1989; **57**: 1139–1146.
- [46] VINSON CR, SIGLER PB, McKNIGHT SL. Scissors-grip model for DNA recognition by a family of leucine zipper proteins. *Science* 1989; **246**: 911–915.
- [47] WEISS MA Thermal unfolding studies of a leucine zipper domain and its specific DNA complex: implications for scissors grip recognition. *Biochemistry* 1990; **29**: 8020.
- [48] WOLBERGER C, DONG Y, PTASHNE M, HARRISON SC. Structure of a phage 434 Cro/DNA complex. *Nature* 1988; **335**: 789–795.

Otrzymano: –

Przyjęto: 24.06.1997 r.

Adres autora: 61-704 Poznań, Noskowskiego 12/14

MODELOWANIE MOLEKULARNE ODDZIAŁYWANIA TRP REPRESOR – DNA

MOLECULAR MODELLING OF THE TRP REPRESSOR – DNA INTERACTION

Grzegorz JEZERSKI

Zakład Biofizyki, Instytut Biologii Molekularnej, Uniwersytet Jagielloński, Kraków

Streszczenie: Modelowanie molekularne obejmuje szereg metod symulacji i jest obecnie nie tylko niezbędnym narzędziem stosowanym przy rozwiązywaniu struktury biocząsteczek, lecz także może służyć jako niezależna metoda, będąca uzupełnieniem i weryfikacją eksperymentu. Zastosowanie metod modelowania molekularnego do symulacji trp represora oraz jego oddziaływania z tryptofanem i DNA pozwoliło wyciągnąć interesujące wnioski odnośnie charakterystyki strukturalnej, a szczególnie dynamicznej kompleksu trp represora z DNA; w tym także roli wody. Cytowane wyniki symulacji wykazują dość dobrą zgodność z wynikami eksperymentalnymi. Rozwój techniki komputerowej pozwoli w niedalekiej przyszłości zarówno na zastosowanie wierniejszych modeli fizycznych układów biologicznych, jak i na zwiększenie przestrzennej i czasowej skali symulacji makrocząsteczek biologicznych.

Słowa kluczowe: trp represor, korepresor, operator, spektroskopia NMR, analiza rentgenograficzna.

Summary. Molecular modelling consists of numerous methods for simulation and at present its not only an indispensable tool being applied for solving structures of biomolecules, but it may also serve as an independent method, being completion and verification of an experiment. The application of molecular modelling methods for simulation of trp repressor and its interaction with tryptophan and DNA has allowed to reach interesting conclusions referring to structural, but especially dynamic characteristics of a trp complex with DNA; including also a role of water. Cited results of the simulations present quite a good agreement with experimental results. The development of computer technique will allow in not far future for an application of more accurate physical models, as well as increase of a spatial and temporal scale of simulation of biological macromolecules.

Key words: trp repressor, corepressor.

1. WSTĘP

Represor tryptofanu (trp represor) jest dimerycznym białkiem o masie 25 kDa, zawierającym 108 reszt aminokwasowych. Białko to reguluje inicjację transkrypcji DNA w *Escherichia coli* przyłączając się do odcinków operatorowych w pięciu operonach: trpEDCBA, trpR, aroH, aroL i mtr. Przyłączenie się represora do tych odcinków indukowane jest nadmiernym stężeniem L-tryptofanu w komórce bakterii, który w takim wypadku wiąże się z represorem. Przyłączenie się represora do operatorowego odcinka trpEDCBA powoduje blokadę syntezy tryptofanu, tryptofan pełni zatem rolę korepresora. Trp represor występuje w dwóch formach: holorepresora – zawierającego tryptofan (1 cząsteczka tryptofanu na monomer) i aporepresora – bez tryptofanu (patrz np. [26, 27]).

Korepresor, wiążąc się niekowalencyjnie do represora, powoduje znaczne zwiększenie powinowactwa represora do odcinków operatorowych i w konsekwencji regulację ekspresji kilku genów. Z punktu widzenia biofizyki mechanizm ten jest przykładem sprzężenia zwrotnego wielokierunkowego, opartego na kooperatywnym oddziaływaniu białko–ligand, a szczególowe jego wyjaśnienie stanowi ważny problem w biologii komórki, biotechnologii i biochemii.

2. PODSTAWY TEORETYCZNE MODELOWANIA MOLEKULARNEGO

Procesy oddziaływania białek z DNA cechują się wysokim stopniem złożoności; w badaniu ich wykorzystuje się szereg zaawansowanych metod biologii molekularnej, genetyki, chemii i fizyki – żadna z nich jako taka nie dostarcza jednak zadowalającego i jednocześnie spójnego obrazu strukturalnego, dynamicznego i funkcjonalnego tegoż procesu.

Modelowanie molekularne stanowi grupę metod, wykorzystujących odmienne podejście do zagadnienia. Są to metody w zasadzie teoretyczne, a ich istota polega na potraktowaniu badanego układu (np. biologicznego) jako układ modelowy o specyficznych własnościach. W przypadku metod stosujących podejście nie uwzględniające *explicite* efektów kwantowych i relatywistycznych czyni się przede wszystkim następujące założenia*:

- * Układ reprezentowany jest przez zbiór atomów jako najmniejszych jego elementów. Dokonujemy rozdzielania ruchów elektronów i jąder (przybliżenie Borna-Oppenheimera), a następnie zaniedbujemy elektrony.
- * Każdy atom obdarzony jest ładunkiem i masą oraz ma zdefiniowane poło-

* Nie wszystkie z nich są oczywiste i można je naturalnie poddać pod dyskusję, ale nie jest to przedmiotem tej pracy.

zenie i prędkość; wzajemne oddziaływania atomów definiowane są na gruncie mechaniki klasycznej i elektrostatyki.

- * Na podstawie powyższego założenia definiujemy energię całkowitą (hamiltonian) układu, jako sumę całkowitej energii kinetycznej i całkowitej energii potencjalnej skonstruowanego modelu – tą ostatnią wyznaczamy z tzw. funkcji potencjału, której dobór jest kluczowy dla przeprowadzanej symulacji.
- * W przypadku symulacji ewolucji czasowej zespołu wielu chemicznie jednakowych cząsteczek stosujemy twierdzenie ergodyczne mówiące, że średnia obliczana po czasie (symulacji) jest równa średniej obliczanej po zespole (cząsteczek).
- * Zmiany w układzie zachodzą w sposób odwracalny i ciągły (np. bez przejść fazowych).

Omówione w niniejszej pracy symulacje oddziaływania trp represor–DNA przeprowadzone zostały przy użyciu następujących metod (patrz np. [14]):

1) Minimalizacja energii – metoda optymalizacji struktury układu molekularnego, w istocie polegająca na numerycznym rozwiązywaniu równania:

$$\frac{\partial V}{\partial \vec{r}_i} = 0 \quad (1)$$

gdzie: V – funkcja potencjału, \vec{r}_i – współrzędne atomu i -tego.

2) Dynamika molekularna – symulacja ewolucji czasowej układu z zastosowaniem praw dynamiki Newtona do opisu ruchu atomów. Na każdy atom w rozważanym układzie, o współrzędnych \vec{r}_i oraz masie m_i działa siła \vec{F}_i ; równania opisujące ewolucję czasową takiego układu będą miały postać:

$$m_i \frac{d^2 \vec{r}_i}{dt^2} = \vec{F}_i(\vec{r}_i) \quad (2a)$$

$$\vec{F}_i(\vec{r}_i) = -\nabla_i V(\vec{r}_i) \quad (2b)$$

3) Symulowane wyżarzanie (ang. *simulated annealing*) – szczególny przypadek dynamiki molekularnej, w którym stosujemy zwiększenie energii kinetycznej atomów do znacznej wartości, najczęściej odpowiadającej temperaturze 1000 K. Pozwala to na przekroczenie barier potencjału, związanych np. z przejściami konformacyjnymi i jest istotne w poszukiwaniu minimum energii układu cząsteczek, odpowiadającego trwałej konfiguracji.

4) Monte Carlo – metoda polegająca na losowym generowaniu rozkładów w zadanym zespole statystycznym. Stosowana jest m.in. do losowego rozmieszczania cząsteczek i losowego przypisywania im wartości pewnych wielkości fizycznych.

5) Zaburzenie entalpii swobodnej – metoda, służąca głównie do obliczania stałej asocjacji kompleksu: enzym – substrat zmodyfikowany, gdy znana jest analogiczna stała dla kompleksu: enzym – substrat oryginalny. W najogólniejszym zarysie wprowadzamy modyfikację chemiczną modelowego układu, co naturalnie zmienia hamiltonian układu; następnie obliczamy wartości zaburzonego hamiltonianu, otrzymując zmianę energii ΔE przy zaburzeniu w temperaturze T . Zmianę entalpii swobodnej obliczamy ze wzoru*:

$$\Delta G = -kT \ln \langle \exp(-\Delta E/kT) \rangle \quad (3)$$

gdzie: k – stała Boltzmanna, a nawias trójkątny oznacza średniowanie po zespole. Stąd łatwo wyliczyć szukaną stałą asocjacji, a także wartości innych funkcji termodynamicznych.

Powyższe metody, z wyjątkiem metody 5), są rutynowo stosowane w procesie rozwiązywania struktury wyznaczonej przy pomocy NMR oraz w procesie udoładniania struktury otrzymywanej z dyfrakcji rentgenowskiej. Metody 1) – 5) stosuje się także do niezależnych symulacji. W wyniku modelowania molekularnego otrzymujemy wielkości fizyczne, pozwalające scharakteryzować rozważany układ (np. białczącetek) zarówno pod względem strukturalnym, jak i dynamicznym.

3. CHARAKTERYSTYKA STRUKTURALNA ODDZIAŁYWANIA TRP REPRESOR – DNA

3.1. Rola struktury czwartorzędowej trp represora w oddziaływaniu z DNA

Struktury apo- i holorepresora (także w kompleksie z DNA) zostały zbadane za pomocą dyfrakcji rentgenowskiej [20, 25, 17] oraz NMR [27, 26]. Jak wynika z tych badań, struktury wyznaczone przy pomocy obu metod są jednakowe; jeden monomer represora składa się z sześciu helis, oznaczonych literami A–F, a monomery oddziałują ze sobą poprzez oddziaływania elektrostatyczne i van der Waalsa. Helikalne odcinki łańcucha stanowią większość cząsteczki białka – pozostałe reszty tworzą kłębek statystyczny, względnie skręty. Helisy: A, B, C, F tworzą rdzeń hydrofobowy białka, natomiast odcinek: helisa D – skręt – helisa E stanowi domenę wiążącą się do DNA, a także częściowo uczestniczącą we wiązaniu tryptofanu.

Warunkiem koniecznym związania się trp represora do operatorowego odcinka DNA jest palindromiczność tego odcinka, a ściślej symetria jego sekwencji względem dwukrotnej osi obrotu. Symetria ta odpowiada symetrii białka, które, jak wiadomo, ma strukturę czwartorzędową C_2 . Zmiana powinowactwa represora do DNA jest

* Jest to często stosowana, lecz nie jedyna metoda obliczania zmiany entalpii swobodnej w tej metodzie.

procesem kooperatywnym – obejmuje sprzężone ze sobą zmiany struktury trzeciorzędowej w poszczególnych podjednostkach, zachowawcze względem symetrii podjednostek, a więc zachodzące bez zmiany struktury czwartorzędowej [18]. Związywanie się domeny jednego z monomerów do DNA wiąże się ze zmniejszeniem entropii translacyjnej i rotacyjnej zarówno represora, jak i operatora; związywanie się drugiej domeny najprawdopodobniej powoduje, że zmniejszenie entropii nie jest tak duże [21] – w konsekwencji proces jest znacznie bardziej korzystny energetycznie.

3.2. Zwiększenie powinowactwa trp represora do DNA przez związanie tryptofanu

Zasadniczą rolę w procesie oddziaływania trp represora z DNA, oprócz dopasowania symetrii, odgrywa także fizykochemiczne dopasowanie represora i DNA, charakteryzowane przez stałą dysocjacji kompleksu represor–DNA, która wynosi 0,2–0,5 nM [18]. Warunkiem utworzenia się tego kompleksu jest taka zmiana strukturalna represora, która spowoduje zwiększenie powinowactwa represora do DNA; indukowana jest ona niekowalencyjnym związaniem L-tryptofanu przez trp represor.

Cząsteczka tryptofanu wiąże się w tzw. kieszeni (wnęce), tworzonej przez reszty: 40–44 (C-końcowy odcinek helisy B), Arg54 (helisa C), Arg84, Gly85 i Ser88 (helisa E). Obszar między łańcuchami bocznymi obu arginin wypełniają cząsteczki wody – jedna z nich związana jest wiązaniem wodorowym z tlenem grupy karbonylowej Leu41. Nadmiar stężenia tryptofanu sprawia, że dyfunduje on łatwiej do wnęk między łańcuchami białka. Cząsteczka tryptofanu zastępuje w kieszeni słabo związane i bardziej ruchliwe cząsteczki wody, tworząc wiązania wodorowe – atomy tlenu ujemnie naładowanej grupy karboksylowej tryptofanu wiążą się z łańcuchami bocznymi Arg84 i Thr44; grupa aminowa natomiast tworzy trzy wiązania wodorowe – atomy wodoru o cząstkowych ładunkach dodatnich wiążą się z atomami tlenu reszt: Ser88 (łańcuch boczny), Asn40 i Leu41 (łańcuch główny) [20, 26], [18]. Istotność wiązań wodorowych z udziałem grupy aminowej tryptofanu wykazana została przez zbadanie struktury trp represora związanego z 3-indolopropionianem [19]. Związek ten różni się od tryptofanu brakiem grupy aminowej, co uniemożliwia wytworzenie odpowiednich wiązań wodorowych; w efekcie 3-indolopropionian wiąże się w tym samym miejscu, ale przyjmując orientację odwrotną do orientacji tryptofanu. O ścisłej odpowiedniości strukturalnej L-tryptofanu i kieszeni wiążącej świadczy fakt słabego powinowactwa D-tryptofanu do trp represora [25]; co więcej – L-tryptofan wiąże się z aporepresorem w stanie krystalicznym, powodując rozpad kryształów [25], co jest dowodem, że powinowactwo korepresora do represora jest na tyle silne, że pozwala przewyciężyć siły stabilności sieci krystalicznej.

Jedną z pierwszych prób modelowania molekularnego oddziaływania trp represora z DNA było modelowanie aporepresora i holorepresora, obejmujące pro-

cedury minimalizacji energii i dynamiki molekularnej tych układów [6, 4]. Obliczenia przeprowadzone zostały przy użyciu programu AMBER, wersja 3.0. Minimalizacja energii oraz symulacja 30 ps dynamiki molekularnej, opisane w pracy [6], pozwoliły na porównanie własności dynamicznych obu struktur (patrz pkt. 4.1.), przetestowanie funkcji potencjału typu AMBER [24] (nazwy tej nie należy mylić z nazwą programu AMBER, służącego m.in. do obliczeń metodami mechaniki molekularnej i dynamiki molekularnej) w zastosowaniu do modelu uwodnionego białka średniej wielkości oraz zbadanie zmian strukturalnych w wyniku zastosowania dynamiki molekularnej do struktur rozwiązanych krystalograficznie. Porównania struktury symulacyjnej do struktury wyjściowej (zdeponowanej w *Protein Data Bank*; kody: 1WRP - holorepresor, 3WRP - aporepresor) autorzy dokonali, obliczając średnie odchylenie kwadratowe współrzędnych atomów węgla obu struktur. Wyniki przedstawiono zwięźle w tabeli 1.

Odchylenia struktury symulowanej od struktury wyjściowej są znacznie większe dla aporepresora niż dla holorepresora nie tylko w obrębie odcinków o wysokich odchyleniach, lecz na całym łańcuchu. Oznacza to, że holorepresor wykazuje zwiększoną stabilność; innymi słowy związanie tryptofanu indukuje proces korzystny energetycznie, jakim jest zmiana struktury represora. Największe odchylenia ($> 3,5 \text{ \AA}$) obserwowane są dla odcinka uczestniczącego w oddziaływaniu z DNA; interpretować to można w ten sposób, że odcinek ten charakteryzuje się zmniejszoną stabilnością względem reszty łańcucha oraz zwiększoną ruchliwością – analogiczny wniosek wysnuć można także na podstawie analizy charakterystyki dynamicznej represora (patrz pkt. 4.1.).

Podczas wiązania się korepresora do represora istotną rolę pełnią, oprócz wiązań wodorowych, oddziaływania niewiążące: dalekiego zasięgu (kulombowskie) i bliskiego zasięgu (van der Waalsa). Na podstawie danych krystalograficznych oraz NMR można łatwo wywnioskować, że zasadniczy wkład tych oddziaływań do całkowitej energii wiązania korepresor–represor pochodzi od reszt argininowych Arg84 i Arg54 w mikrootoczeniu korepresora. Łańcuchy węglowe tych reszt oddziałują z układem indolowym tryptofanu przez względnie silne oddziaływania van der Waalsa (hydrofobowe). Przy pomocy modelowania molekularnego grupa Komeiji [9] wskazała na istotną rolę dwóch innych reszt aminokwasowych w tworzeniu kieszeni wiążącej tryptofan. Przeprowadzono obliczenia metodą dynamiki molekularnej, połączonej z metodą zaburzenia entalpii swobodnej, stosując symulowaną mutację Ser88→Cys (całkowity czas symulowany = 117,5 ps; program AMBER, wersja 3,0). Obliczono zmianę ujemnego powinowactwa* tryptofanu do trp represora zaistniałą w wyniku tej mutacji [9]; porównano ją z wartością eksperymentalną [2] – wartości te przedstawiono poniżej:

Wartość obliczona: $\Delta\Delta G_{\text{cal}} = 1,58 \pm 0,28 \text{ kcal/mol}$

Wartość eksperymentalna: $\Delta\Delta G_{\text{exp}} = 1,7 \pm 0,3 \text{ kcal/mol}$

* Powinowactwo chemiczne definiuje się jako $-\Delta G$.

Tabela 1. Wartości i zakresy średnich odchyłeń kwadratowych struktury symulowanej (dynamicznej) od rentgenograficznej

	Odchylenie całkowite	Odcinki łańcucha o największym odchyleniu (>3,5 Å)	
		Aminokwasy	Obszary struktury II-rzędowej
Holorepresor	1,95 Å	64, 77–78	kłębek statystyczny, odc. N-końcowy helisy E
Aporepresor	2,91 Å	63–81, 107–108	helisa D + dwa odc. kłębka statystycznego, C-końiec

Jak widać, wartość otrzymana w wyniku modelowania jest w dobrej zgodności z wartością eksperymentalną. Dodatnia wartość $\Delta\Delta G$ oznacza zmniejszenie powinowactwa tryptofanu do trp represora w wyniku mutacji Ser88→Cys.

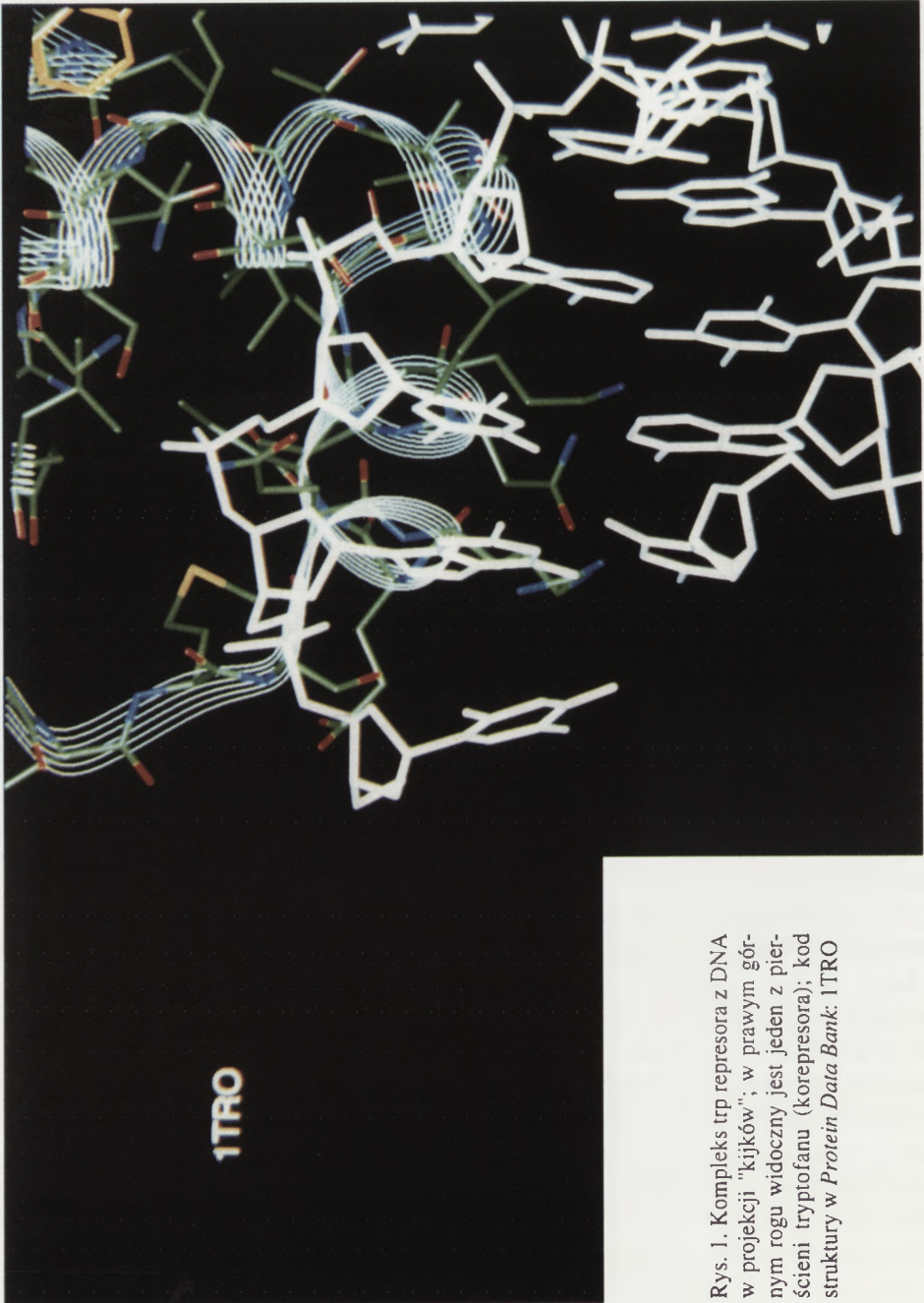
Jak pokazano w pracy [8], w wiązaniu tryptofanu ważną rolę odgrywa także glicyna 85. W pracy tej przedstawiono obliczenia metodą zaburzenia entalpii swobodnej, z zastosowaniem symulowanych mutacji Gly85 na: Ala, Val, Leu, Trp. Obliczenia wykonano przy pomocy programu AMBER, wersja 3,0; całkowity czas symulowany dla każdej mutacji wynosił 115 ps – z wyjątkiem mutacji Gly→Trp, gdzie metoda nie dała zbieżności; w przypadku pozostałych mutacji uzyskano wartości $\Delta\Delta G_{cal} \geq 3$ kcal/mol. Zaobserwowano zatem spadek powinowactwa tryptofanu do kieszeni wiążącej. Wyniki obliczeń zgadzały się z wynikami biochemicznych badań analogicznych mutacji [8].

3.3. Kompleks trp represor–DNA

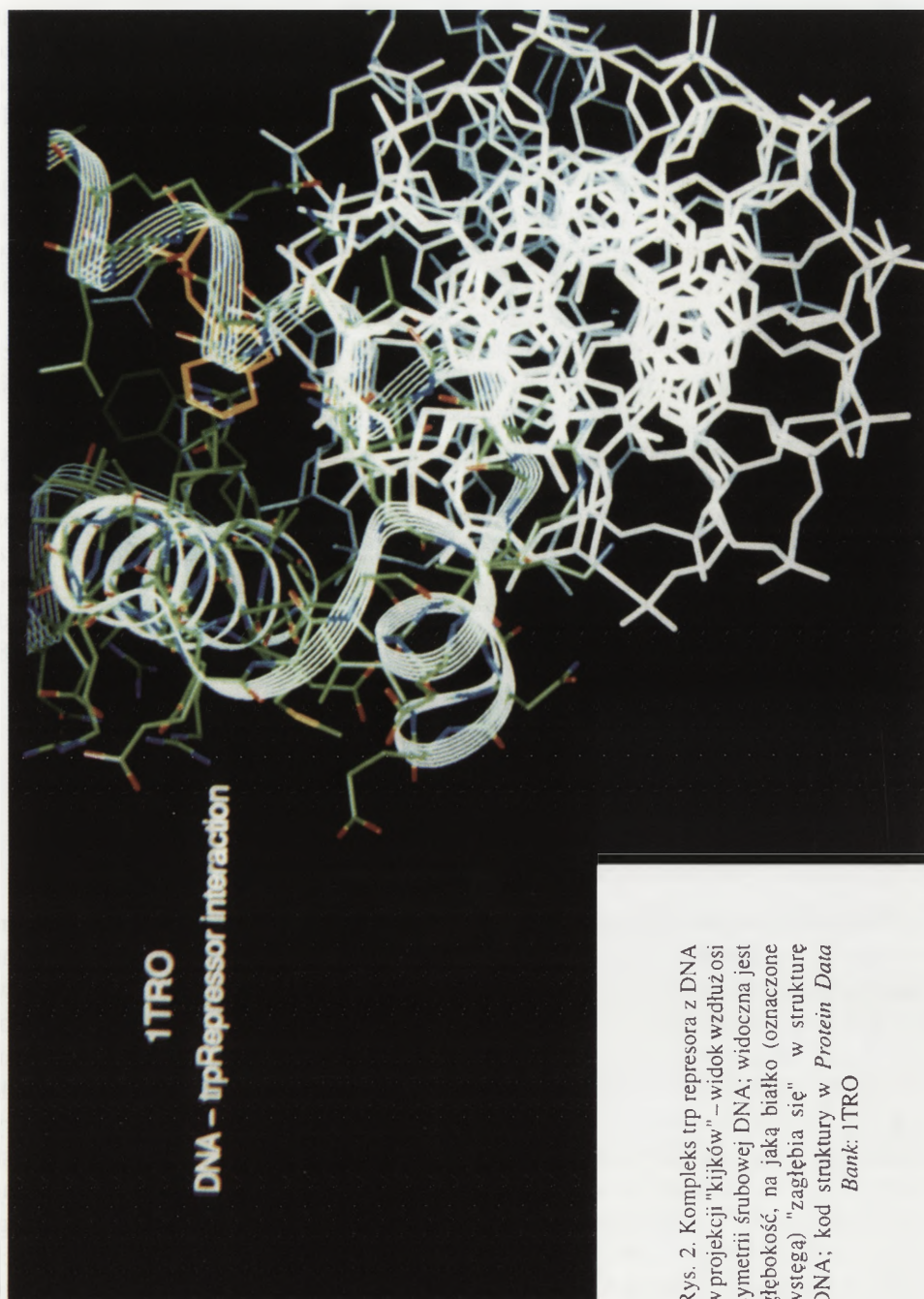
Trp represor wiąże się z 18-zasadowym odcinkiem operatorowym w stosunku molowym represor–operator 1:1, natomiast z odcinkiem 36-zasadowym w stosunku 2:1 [26]; w rozwiązanej strukturze krystalicznej kompleksu represora z modelowym operatorem [13] przy stechiometrii 2:1 (4:2) zaobserwowano wiązanie tandemowe, tzn. takie, że w kompleksie z DNA łańcuch jednej cząsteczki represora oddziałuje z łańcuchem drugiej.

W ogólnym zarysie trp represor wiąże się do bruzdy większej DNA, przez wiązania wodorowe, oddziaływania elektrostatyczne i oddziaływania van der Waalsa; oddziaływania te występują przede wszystkim między grupami bocznymi aminokwasów domeny helisa–skręt–helisa represora a rdzeniem fosfocukrowym DNA. Są one na tyle silne, że powodują deformację struktury DNA – obniża to energię kompleksu białko–DNA. Zbliżenie oddziałujących ze sobą fragmentów białka i DNA w kompleksie przedstawiono na rysunkach 1 i 2.

Obraz ten w istocie jest nieco bardziej skomplikowany. Helisa E dopasowuje się do bruzdy większej, oddziałując z zasadami w DNA, natomiast helisa D leży głównie poza bruzdą większą. Aby ocenić trwałość wiązań wodorowych między



Rys. 1. Kompleks trp represora z DNA w projekcji "kijków"; w prawym górnym rogu widoczny jest jeden z pierścieni tryptofanu (korepresora); kod struktury w *Protein Data Bank*: 1TRO



Rys. 2. Kompleks trp represora z DNA w projekcji "kijków" – widok wzdłuż osi symetrii śrubowej DNA; widoczna jest głębokość, na jaką białko (oznaczone wstęgą) "zagłębia się" w strukturę DNA; kod struktury w *Protein Data*

Bank: 1TRO

białkiem a DNA, przeprowadzono obliczenia metodą symulowanego wyżarzania, stosując strukturę otrzymaną z NMR jako wyjściową [26]. Jak wynika z przeprowadzonego modelowania, grupa guanidynowa Arg69 tworzy silne wiązania wodorowe z atomami tlenu guaniny 2 i tyminy 3. Trwałe wiązania wodorowe z DNA tworzone są także przez następujące reszty aminokwasowe i zasady: Lys72–G16, Ile79–G16(A15), Ala80–A15, Thr83–A4, Arg84–C13. Autorzy pracy [26] podają, że tryptofan (korepresor) oddziałuje z łańcuchem głównym DNA przez oddziaływania van der Waalsa. Wydaje się, że tryptofan tworzy krótko żyjące wiązanie wodorowe między wodorem układu indolowego a tlenem grupy fosforanowej przy cytozynie 13; dla struktury z NMR (kod *Protein Data Bank*: 1TRO, łańcuchy białkowe A i C) odpowiednie odległości wodór–tlen wynoszą: 1,81 i 1,92 Å (dwie cząsteczki tryptofanu wiążące się z dimerem). Ponadto wiązania wodorowe o mniejszej trwałości mogą tworzyć pary: Arg54–C13, Glu68–G2(T3), Thr81–T14, Lys90–T3.

W oddziaływaniu represora z DNA ważną rolę może też odgrywać odcinek N-końcowy białka [7]; wykazuje on znaczne nieuporządkowanie w porównaniu do pozostałego fragmentu łańcucha, na tym odcinku występują też znaczące rozbieżności pomiędzy strukturą w roztworze a strukturą krystaliczną [26] – świadczy to o dużej ruchliwości tego odcinka. W przypadku wiązania tandemowego N-koniec jednego dimeru oddziałuje z łańcuchem drugiego dimeru [5]. Znaczący wkład do tego oddziaływania wnoszą wiązania wodorowe między Tyr7 dimeru 1 a Ser86 i Arg97 dimeru 2 [13].

4. CHARAKTERYSTYKA DYNAMICZNA ODDZIAŁYWANIA TRP REPRESOR–DNA

4.1. Symulacje dynamiki molekularnej

Wnioski na temat dynamiki modelowego układu cząsteczek w roztworze można wyciągnąć, analizując fluktuacje struktury, czyli współrzędnych tego układu (średnie odchylenia kwadratowe od struktury uśrednionej). Analizując 30-pikosekundową symulację trp represora w formach holo- i apo-, przeprowadzoną przez grupę Kollmana [6], można zaobserwować znaczny wzrost fluktuacji w odcinkach: N-końcowym, C-końcowym i helisa D–skręt–helisa E. W istocie, końcowe odcinki łańcucha polipeptydowego wykazują względnie duże nieuporządkowanie w strukturze krystalicznej, skąd można wnioskować, że są to reszty o dużej ruchliwości. Co się tyczy fluktuacji w domenie wiążącej DNA, to w przypadku holorepresora wykazuje ona zmniejszenie na odcinku helisy E w porównaniu z aporepresorem; prócz tego można zaobserwować zwiększoną fluktuację w skrajnym obszarze domeny wiążącej DNA i fragmencie "skrętu" (w zasadzie kłęбка statystycznego) – są to reszty: 64–70 – w modelach obu form represora. Zmniejszona ruchliwość helisy E holo-

represora jest prawdopodobnie spowodowana tym, że tryptofan wiąże się głównie z aminokwasami helisy E.

Analogiczne wnioski można wyciągnąć na podstawie symulacji dynamiki molekularnej przeprowadzonej przez grupę Komeiji [11]. W wyniku obliczenia fluktuacji symulowanych dynamicznych trajektorii uwodnionych struktur holo- i aporepresora (czas symulowany = 150 ps dla każdej z form; program AMBER, wersja 3.0) autorzy uzyskali dobrą zgodność z fluktuacjami struktury krystalicznej, obliczonymi na podstawie rentgenograficznych czynników temperaturowych. Analiza symulacji ujawnia także, że w wyniku związania tryptofanu zwiększa się fluktuacja na odcinku helisy D, co jest zgodne z wynikiem symulacji przeprowadzonej przez grupę Kolmana [6]. Wyniki modelowania pozwoliły ugruntować trójdomenowy model dynamicznej struktury trp represora [11]:

- * rdzeń wewnętrzny – nie uczestniczący w oddziaływaniach kooperatywnych; helisy: A, B, C; reszty: 13-64.
- * domena (głowica) wiążąca DNA – charakteryzuje się zwiększoną ruchliwością; helisy: D, E; reszty: 65-92,
- * rdzeń wewnętrzny – część bardziej elastyczna w porównaniu do pierwszej domeny rdzenia; helisa F; reszty: 93-104.

Reszty: 1-12 i 105-108 tworzą odcinki N- i C-końcowy trp represora.

4.2. Skala czasowa a model dynamiczny oddziaływania

Charakterystyki dynamicznej oddziaływania białko–DNA dokonuje się w przypadku badań NMR przez analizę czasów korelacji i parametrów uporządkowania oraz przez zastosowanie dla modelowego układu kombinacji metod: symulowanego wyżarzania, dynamiki molekularnej i Monte Carlo (patrz [28] – opisana jest tam kompleksowa procedura modelowania molekularnego struktury otrzymanej z NMR, często stosowana w badaniach trp represora.). Z analiz tego typu przeprowadzonych dla trp represora [29] wynika, że ruchy łańcucha polipeptydowego na skalę pikosekundową i nanosekundową są ograniczone zarówno w obszarze hydrofobowego rdzenia, jak i domen wiążących DNA. Autorzy sugerują raczej "niestabilność strukturalną" domeny helisa–skręt–helisa niż jej większą ruchliwość. Analiza czasów relaksacji dla domeny wiążącej DNA prowadzi do wniosku, że proces wiązania się do DNA składa się z wieloetapowych zmian konformacji białka i odbywa się w skali milisekundowej.

4.3. Czasy życia a model dynamiczny oddziaływania

Istotne dla konstrukcji modelu dynamicznego są czasy życia korepresora w kieszeni wiążącej represora oraz kompleksu represor–DNA. Czas życia L-tryptofanu związanego w kieszeni wiążącej wynosi średnio 200–400 ms, podczas gdy czas

życia kompleksu represor–DNA wynosi 1–2 s [26]. Nasuwa się tu wniosek, że tworzenie i rozpad tego kompleksu jest procesem dynamicznym, jednakże niezwykle powolnym w skali cząsteczkowej. W pracy [26] rozróżniane są trzy dynamiczne procesy składające się na oddziaływanie represora z DNA i zachodzące w porównywalnych skalach czasowych:

- * "otwarcie" i "zamknięcie" helisy na odcinkach domen wiążących DNA,
- * wymiana tryptofanu w kieszeni wiążącej,
- * asocjacja i dysocjacja kompleksu represor–DNA.

5. ROLA WODY W ODDZIAŁYWANIU TRP REPRESOR–DNA

5.1. Model struktury uwodnionej

Fakt uwzględnienia cząsteczek wody w układzie wyjściowym do modelowania molekularnego, ważny w symulacjach każdej biocząsteczki, nabiera jednak szczególnego znaczenia w przypadku symulacji oddziaływania trp represora z DNA, wiązanie represora do DNA odbywa się bowiem za pośrednictwem cząsteczek wody [26]. Uwzględnienie w modelu wyjściowym wody jest istotne nawet przy modelowaniu samego represora, co zostało wykazane przez grupę Kollmana [4]; praca ta prezentuje m.in. wyniki 40-pikosekundowych symulacji dynamiki molekularnej trp represora z wykorzystaniem szeregu modeli zarówno struktur uwodnionych, jak i struktur modelowanych w próżni. Obecnie modyfikuje się pogląd na rolę wody we współtworzeniu struktury DNA – szereg badań strukturalnych (m.in. trp represora) [22] wskazuje na obecność niewielu cząsteczek wody silnie związanych w określonych miejscach łańcucha polinukleotydowego, prócz słabiej związanych cząsteczek wody tworzących sferę hydratacyjną.

Modelowanie struktury białkowej w środowisku wodnym może dostarczyć informacji odnośnie ruchliwości cząsteczek wody w otoczeniu określonych atomów białka oraz odnośnie tworzenia się stref hydratacyjnych. Symulacja dynamiki molekularnej holorepresora [10] pokazała istnienie w modelowym układzie strefy (o grubości $\approx 10 \text{ \AA}$) zmniejszonej ruchliwości rozpuszczalnika wokół wszystkich aminokwasów; zrodziło to sugestię, że rodzaj atomu zasadniczo nie wpływa na ruchliwość otaczającego go rozpuszczalnika. Prócz tego, przeprowadzona analiza funkcji rozkładu radialnego atomów tlenu w cząsteczkach wody, otaczających atomy białka wykazała tworzenie się pierwszej strefy hydratacyjnej – o grubości $2,8 \text{ \AA}$ wokół atomów polarnych i zjonizowanych oraz $3,4 \text{ \AA}$ wokół atomów niepolarnych. Wyniki tej pracy sugerują istnienie hydrofobowej otoczki hydratacyjnej, "usztynionej" przy pomocy wiązań wodorowych między cząsteczkami wody i oddziałującej z atomami reszt niepolarnych przez oddziaływania elektrostatyczne i van der Waalsa.

5.2. Szybkość wymiany cząsteczek wody

Analiza czasów życia cząsteczek wody w poszczególnych obszarach białka, przeprowadzana przy pomocy spektroskopii NMR, dostarcza informacji odnośnie trwałości wiązań wodorowych tworzonych z udziałem wody. Wziąwszy pod uwagę prace [10] i [22] wydaje się, że dla większości kompleksów typu białko-represorowe-DNA zależności szybkości wymiany cząsteczek wody od miejsca w kompleksie są podobne. Powyższe sformułowanie staje się istotne w świetle wyników 2-nanosekundowej symulacji dynamiki molekularnej kompleksu DNA z domeną wiążącą DNA (homeodomeną) *Antennapedia* [1].

Wnioski, głównie z prac [22, 1 i 3] odnośnie czasów życia cząsteczek wody w określonych miejscach kompleksu białko-DNA przedstawiono w tabeli 2.

Jeśli chodzi o czasy życia cząsteczek wody w przestrzeni między białkiem a DNA (rubryka dolna tabeli 2), szacowane były one zarówno na podstawie metod spektroskopowych i obliczeniowych; wnioskuje się, że leżą one w zakresie 1 ns – 200 μ s [16, 15]. Najdłuższe czasy życia (> 50 ms) wykazują cząsteczki wody zaangażowane w wiązania wodorowe typu: białko-woda-DNA [26]; w przypadku trp represora są to trzy cząsteczki wody wiążące się z zasadami DNA [17]. Szybkość wymiany tych "pośredniczących" cząsteczek wody jest co najmniej o trzy rzędy mniejsza, niż szybkość wymiany pozostałych cząsteczek, które dyfundują do przestrzeni między białkiem a DNA. Te z kolei cząsteczki wody wymieniają się znacznie wolniej, niż "powierzchniowe" cząsteczki wody. Powyższe spostrzeżenia odnośnie dynamicznej struktury kompleksu białko-DNA są istotne w przypadku konstrukcji

Tabela 2. Czasy życia cząsteczek wody w kompleksie białko-DNA na podstawie badań NMR i symulacji dynamiki molekularnej (podano odnośniki)

Klasy cząsteczek wody [22]	Czasy życia w stałym miejscu [22]	Miejsca występowania
Niezależne cząsteczki rozpuszczalnika (ang. <i>bulk water</i>)	1–10 ps	strefa roztworu w odległości od atomów białka > 10 Å [10]
Woda słabo związana	10 ps–1 ns	<ul style="list-style-type: none"> • woda związana z powierzchnią białka [22] • bruzda większa DNA [1]
Woda silnie związana	> 1 ns	[1]: <ul style="list-style-type: none"> • wnęki hydrofilowe na powierzchni białka • wnętrze białka • bruzda mniejsza DNA • przestrzeń między białkiem a DNA [26]: <ul style="list-style-type: none"> • cząsteczki wody pośredniczące w wiązaniu się białka do DNA

modelu wyjściowego do procedury modelowania molekularnego, a także w przypadku podejmowania jakichkolwiek badań strukturalnych – wszak wyniki każdego badania można zinterpretować jedynie na podstawie założonego modelu.

6. PODSUMOWANIE. PERSPEKTYWY

Techniki modelowania molekularnego makrocząsteczek biologicznych znajdują się obecnie w początkowej fazie swego rozwoju. Ponieważ klasyfikowane są one zwykle jako interdyscyplinarny dział nauk matematyczno-przyrodniczych, zatem zarówno interpretacja wyników uzyskanych tymi technikami, jak i prognozowanie trendów w ich rozwoju wymaga holistycznego podejścia do problemu.

Oddziaływanie trp represora z DNA jest procesem w dużej mierze poznanym, przy czym znacznie więcej wiemy na temat charakterystyki strukturalnej tego oddziaływania. Nieco inaczej przedstawia się ten problem od strony charakterystyki dynamicznej; obecnie istnieje niewiele metod, pozwalających na efektywne badania dynamiki makrocząsteczek biologicznych z dużą rozdzielczością przestrzenną – należą tu rozmaite warianty metod jądrowego i elektronowego rezonansu magnetycznego; jednak wykazują one szereg ograniczeń, np. wielkość badanej cząsteczki, konieczność stosowania izotopów czy znaczników itd.

Modelowanie molekularne stanowi nie tylko niezbędne narzędzie przy rozwiązywaniu struktury za pomocą spektroskopii NMR lub udokładnianiu struktury rozwiązanej rentgenograficznie; może też stanowić dogodne uzupełnienie innych badań dynamiki biocząsteczek, takich jak fluorymetria i dichroizm kołowy; wreszcie stanowi niezależną metodę badawczą, przy pomocy której można ilościowo i jakościowo dokonać analizy zachowania się modelowego układu, naśladującego układ rzeczywisty.

Naturalnie, zaufanie do wyników otrzymanych z symulacji powinno być ograniczone, ograniczenia te natomiast wypływają z wiedzy o stosowanej metodzie. W konkretnym przypadku oddziaływania trp represora z DNA zasadniczym ograniczeniem są skale czasowe, jakie można brać pod uwagę przy użyciu symulacji; mianowicie w przypadku dynamiki molekularnej jest to obecnie skala 1 fs–10 ns; wyklucza to symulację takich procesów, jak np. asocjacja kompleksu. Inne ograniczenia, to niedoskonałość modelu polegająca na nieuwzględnianiu *explicite* efektów kwantowych, do jakich należy np. tworzenie się i rozpad wiązań wodorowych.

Doskonalenie algorytmów matematycznych, fizycznych modeli struktury i dynamiki biocząsteczek oraz techniki komputerowej pozwoli jednakże w niedalekiej przyszłości na zwiększenie zarówno skali czasowej symulowanych zjawisk, jak i na powiększenie symulowanych układów. Być może powszechnie stosowane będzie połączenie metod mechaniki molekularnej i mechaniki kwantowej, a nawet dynamiki molekularnej i dynamiki kwantowej (patrz [14]), co stworzy możliwość modelowania reakcji chemicznych, transferu protonów i elektronów, czy stanów wzbudzonych

w makrocząsteczkach biologicznych. Duże nadzieje można też wiązać z rozwojem nowych modeli fizycznych znanych już zjawisk, co jest wynikiem nowatorskiej interpretacji obowiązujących praw fizyki i chemii. Wreszcie stosunkowo łatwa do zrealizowania perspektywa dotyczy ścisłej integracji metody eksperymentalnej i obliczeniowej, czego obiecującym przykładem jest zastosowanie metod mechaniki molekularnej i dynamiki molekularnej [23], oraz metody matematycznej (*distance geometry*) [12] przy wyznaczaniu struktury za pomocą spektroskopii NMR.

Podziękowania

Pracę wykonano przy częściowym wsparciu grantu Fundacji na Rzecz Nauki Polskiej BIMOL.

LITERATURA

- [1] BILLETER M, GÜNTERT P, LUGINBÜHL P, WÜTHRICH K. Hydration and DNA recognition by homeodomains. *Cell* 1996; **85**: 1057–1065.
- [2] CHOU WY, MATTHEWS KS. Serine to Cysteine mutation in trp repressor protein alter tryptophan and operator binding. *J Biol Chem* 1989; **264**: 18314–18319.
- [3] GEHRING WJ, QIAN YQ, BILLETER M, FURUKUBO-TOKUNAGA K, SCHIER AF, RESENDEZ-PEREZ D, AFFOLTER M, OTTING G, WÜTHRICH K. Homeodomain-DNA recognition. *Cell* 1994; **78**: 211–223.
- [4] GUENOT J, KOLLMAN PA. Molecular dynamics studies of a DNA-binding protein: 2. An evaluation of implicit and explicit solvent models for the molecular dynamics simulation of the *Escherichia Coli* trp repressor. *Protein Science* 1992; **1**: 1185–1205.
- [5] GÜNES Ç, STAACKED, WILCKEN-BERGMANN von B, MÜLLER-HILL B. Co-operative binding of two trp repressor dimers to α - or β -centred trp operators. *Mol Microbiol* 1996; **20** (2): 375–384.
- [6] HOWARD AE, KOLLMAN PA. Molecular dynamics studies of a DNA-binding protein: 1. A comparison between trp repressor and trp aporepressor aqueous simulations. *Protein Science* 1992; **1**: 1173–1184.
- [7] HURLBURT B, YANOFSKY C. The NH₂-terminal arms of trp repressor participate in repressor-operator association. *Nucl Acids Res.* 1992; **20**: 337–341.
- [8] KOMEIJI Y, FUJITA I, HONDA N, TSUTSUI M, TAMURA T, YAMATO I. Glycine 85 of the trp-repressor of *E. coli* is important in forming the hydrophobic tryptophan binding pocket: experimental and computational approaches. *Protein Eng* 1994; **7** (10): 1239–1247.
- [9] KOMEIJI Y, UEBAYASI M, SOMEYA J, YAMATO I. Free energy perturbation study on a trp binding mutant (Ser88→Cys) of the trp repressor. *Protein Eng* 1992; **5** (8): 759–767.
- [10] KOMEIJI Y, UEBAYASI M, SOMEYA J, YAMATO I. A molecular dynamics study of solvent behavior around the protein. *Proteins* 1993; **16** (3): 268–277.
- [11] KOMEIJI Y, UEBAYASI M, YAMATO I. Molecular dynamics simulations of holo- and aporepressors: domain structure and ligand-protein interaction. *Proteins* 1994; **20** (3): 248–258.
- [12] CRIPPEN GM, HAVEL TF. Distance geometry and molecular conformation. *Research Studies Press*, 1988; U.K.
- [13] LAWSON L, CAREY J. Tandem binding in crystals of a trp repressor/operator half-site complex. *Nature* 1993; **366**: 178–182.

- [14] LESYNG B, Mc CAMMON JA. Molecular modeling methods. Basic techniques and challenging problems. *Pharmac Ther* 1993; **60**: 149–167.
- [15] OTTING G, LIEPINSH E, WÜTHRICH K. Proton exchange with internal water molecules in the protein BPTI in aqueous solution. *J Am Chem Soc* 1991a; **113**: 4363–4364.
- [16] OTTING G, LIEPINSH E, WÜTHRICH K. Protein hydration in aqueous solution. *Science*, 1991b; **254**: 974–980.
- [17] OTWINOWSKI Z, SCHEVITZ RW, ZHANG RG, LAWSON CL, JOACHIMIAK A, MARMORSTEIN RQ, LUISI BF, SIEGLER PB. Crystal structure of *trp* repressor/operator complex at atomic resolution. *Nature* 1988; **335**: 321–329.
- [18] PERUTZ FM. Mechanisms of cooperativity and allosteric regulation in proteins. *Q Rev Biophys* 1989; **22**: 139–236.
- [19] RAMESH V, SYED SEH, FREDERICK RO, SUTCLIFFE MJ, BARNES M, ROBERTS GCK. NMR studies of the mode of binding of corepressors and inducers to *Escherichia Coli trp* repressor. *Eur J Biochem* 1996; **235**: 804–813.
- [20] SCHEVITZ RW, OTWINOWSKI Z, JOACHIMIAK A, LAWSON CL, SIEGLER PB. The three dimensional structure of *trp* repressor. *Nature* 1985; **317**: 787–791.
- [21] SCHLEIF R. DNA binding to proteins. *Science* 1988; **241**: 1182–1187.
- [22] SCHWABE JWR. The role of water in protein–DNA interactions. *Curr Opin Struct Biol* 1997; **7**: 126–134.
- [23] VAN GUNSTEREN VF, KAPTEIN R, ZUIDERWEG ERP. In "Nucleic acid conformation and dynamics". Olson W.K., Ed.; NATO/CECAM: Orsay, 1983.
- [24] WEINER SJ, KOLLMAN PA, CASE DA, SINGH UC, GHIO C, ALAGONA G., PROFETA S, WEINER P. A new forcefield for Molecular Mechanical Simulation of Nucleic Acids and Proteins. 1984; *J Am Chem Soc* **106**:765–784.
- [25] ZHANG RG, JOACHIMIAK A, LAWSON CL, SCHEVITZ RW, OTWINOWSKI Z, SIEGLER PB. The crystal structure of *trp* aporepressor at 1.8 Å shows how binding tryptophan enhances DNA affinity. *Nature* 1987; **327**: 591–597.
- [26] ZHANG H, ZHAO D, REVINGTON M, WEONATAE L, JIA X, ARROWSMITH CH, JARDETZKY O. The solution structures of the *trp* Repressor-Operator DNA complex. *J Mol Biol* 1994; **238**: 592–614.
- [27] ZHAO D, ARROWSMITH CH, JIA X, JARDETZKY O. Refined solution structures of the *Escherichia coli trp* Holo- and Aaporepressor. *J Mol Biol* 1993; **229**: 735–746.
- [28] ZHAO D, JARDETZKY O. Sequential Simulated Annealing: An Efficient Procedure For Structural Refinement Based on NMR Constraints. *J Phys Chem* 1993; **97**: 3007–3012.
- [29] ZHENG Z, CZAPLICKI J, JARDETZKY O. Backbone Dynamics of *Trp* Repressor Studied by ¹⁵N NMR Relaxation. *Biochemistry* 1995; **34**: 5212–5223.

Otrzymano: –

Przyjęto: 24.06. 1997 r.

Adres autora: al. Mickiewicza 3, 31-120 Kraków

ANTYTERMINACJA TRANSKRYPCJI U BAKTERIOFAGA λ^*

TRANSCRIPTIONAL ANTITERMINATION IN BACTERIOPHAGE λ

Grzegorz WĘGRZYN

Katedra Biologii Molekularnej, Uniwersytet Gdański

Streszczenie. Antyterminacja transkrypcji jest jednym ze sposobów regulacji ekspresji genów. Mechanizm ten został po raz pierwszy wykryty u bakteriofaga λ , jednak istnienie podobnych systemów regulacyjnych wykazano później zarówno w operonach bakteryjnych, jak też u wirusów zakazających komórki eukariotyczne (np. HIV). W tym artykule zwrócono największą uwagę na mechanizmy antyterminacji u bakteriofaga λ , a w szczególności na rolę białek kodowanych przez genom faga (N i Q) i gospodarza, *Escherichia coli* (czynniki Nus oraz poszczególne podjednostki polimerazy RNA). Dyskutowane są mechanizmy antyterminacji transkrypcji oraz znaczenie tego procesu w regulacji ekspresji genów.

Słowa kluczowe: Regulacja ekspresji genów, antyterminacja transkrypcji, polimeraza RNA *Escherichia coli*, rozwój bakteriofaga λ , czynniki Nus.

Summary. Transcriptional antitermination is one of the strategies of gene expression regulation. This mechanism was discovered for the first time in bacteriophage λ , but subsequent studies led to demonstration of existence of similar systems in both bacterial operons and eukaryotic viruses (for example in HIV). In this review, transcriptional antitermination in bacteriophage λ , and particularly roles of proteins encoded by the phage (N and Q) and its host, *Escherichia coli*, (Nus factors and RNA polymerase subunits) is considered. The mechanisms of transcriptional antitermination and the role of this process in regulation of gene expression are discussed.

Key words: Regulation of gene expression, transcriptional antitermination, *Escherichia coli* RNA polymerase, bacteriophage λ development, Nus factors.

*Praca finansowana w ramach grantu KBN (projekt nr 6 P04A 059 09).

1. WSTĘP

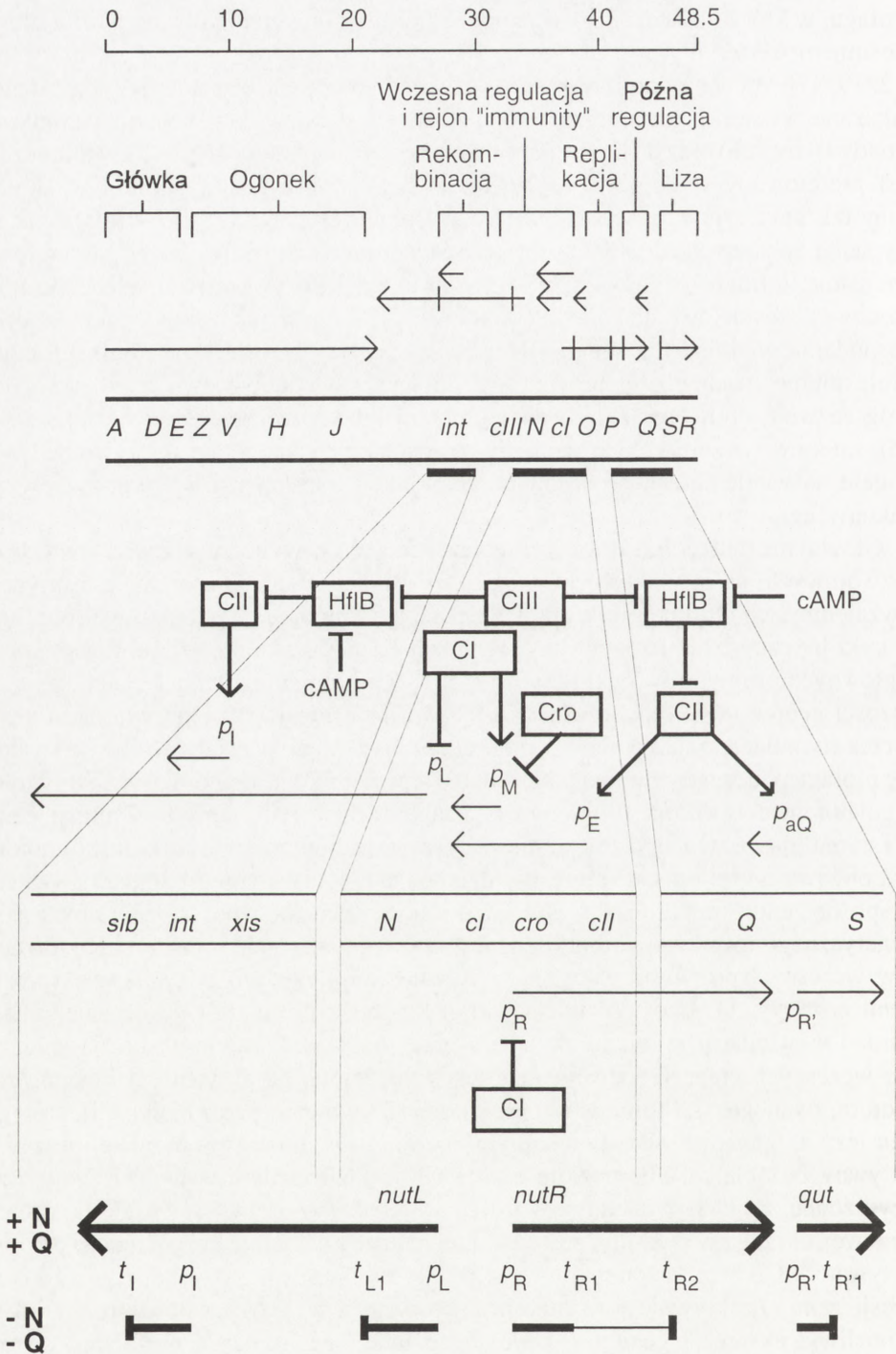
Zarówno w komórkach prokariotycznych, jak i eukariotycznych ekspresja poszczególnych genów regulowana jest na różnych poziomach, od inicjacji transkrypcji do modyfikacji i regulacji stabilności białek. Najczęstszym i wydaje się, że dotychczas najlepiej poznanym sposobem kontroli ekspresji genów jest regulacja częstości inicjacji transkrypcji z danych promotorów. Być może zwracanie szczególnej uwagi na modyfikację aktywności poszczególnych promotorów u modelowych obiektów badawczych spowodowało, że zjawisko antyterminacji transkrypcji zostało po raz pierwszy opisane stosunkowo późno, bo w roku 1969 [36]. Obserwacja ta dotyczyła regulacji ekspresji wczesnych genów bakteriofaga λ , położonych za terminatorem t_{R1} . Najogólniej rzecz ujmując, antyterminacja transkrypcji polega na takiej modyfikacji polimerazy RNA przez różne czynniki białkowe, że enzym ten przestaje rozpoznawać sygnały terminacji transkrypcji, dzięki czemu możliwa staje się ekspresja genów położonych w rejonie za sekwencją terminatora. Późniejsze badania wykazały, że u bakteriofaga λ oraz większości fagów lambdoidalnych istnieją dwa różne mechanizmy antyterminacji transkrypcji. Okazało się, że ten sposób regulacji ekspresji genów występuje także w operonach *rnn* *Escherichia coli* zawierających geny kodujące rybosomalne RNA [16, 23, 30] (mechanizmy regulacji transkrypcji genów kodujących rRNA były omawiane w niedawno opublikowanej pracy przeglądowej [6] i w tym artykule będą jedynie krótko porównane z antyterminacją transkrypcji u bakteriofaga λ). Różnego rodzaju systemy antyterminacji transkrypcji wykryto w różnych operonach nie tylko u *E. coli*, lecz także w kilku innych gatunkach bakterii, takich jak *Bacillus subtilis*, *Klebsiella pneumoniae* i *Pseudomonas aeruginosa* [38]. Ponadto wykazano, że antyterminacja transkrypcji jest jednym ze sposobów regulacji ekspresji genów wirusa HIV, gdzie czynnikiem stymulującym ten proces jest białko Tat [17]. W tym artykule dokładniej omówione zostaną procesy antyterminacji transkrypcji u bakteriofaga λ , których mechanizmy zostały do tej pory najlepiej poznane.

2. CYKL ROZWOJOWY BAKTERIOFAGA λ I ROLA ANTYTERMINACJI TRANSKRYPCJI

Po zakażeniu komórki *Escherichia coli* rozwój bakteriofaga λ może przebiegać na dwa alternatywne sposoby. Rozwój lityczny prowadzi do replikacji DNA wirusa, ekspresji większości jego genów (uproszczona mapa genetyczna faga λ przedstawiona jest na rysunku 1), utworzenia wirionów potomnych oraz ich uwolnienia po lizie komórki gospodarza [14]. Alternatywną drogą rozwojową jest cykl lizogeniczny polegający na integracji DNA faga do genomu gospodarza i przejście w stadium

profaga, w którym materiał genetyczny bakteriofaga jest replikowany wraz z chromosomem bakteryjnym, a ekspresja większości genów wirusa jest zahamowana [12, 19, 47]. Wybór jednej z dwu dróg rozwojowych zależy od stanu fizjologicznego zakażanej komórki gospodarza (który z kolei jest odzwierciedleniem warunków środowiskowych) oraz od liczby fagów zakażających komórkę [11, 34]. Cykl lityczny jest preferowany w bogatych pożywkach (czyli w przypadku szybko rosnących komórek bakteryjnych), w stosunkowo wysokiej temperaturze (37–43°C) oraz w wypadku zakażenia jednej komórki gospodarza przez niewielką liczbę fagów równocześnie. Z drugiej strony, wzrost bakterii w ubogich pożywkach (lub wręcz warunki głodowe), stosunkowo niska temperatura (20–30°C) oraz zakażenie jednej komórki gospodarza wieloma fagami (5 lub więcej) sprzyja przejściu w stadium profaga. Molekularne mechanizmy prowadzące do wyboru jednej z dwu alternatywnych dróg rozwojowych faga λ były przedmiotem kilku prac przeglądowych [11, 34, 45], zatem w tym artykule zagadnienia te zostaną przedstawione skrótowo, jedynie w celu naświetlenia roli procesów antyterminacji transkrypcji w cyklu życiowym bakteriofaga.

Głównymi białkami, od których zależy decyzja o wyborze jednej z dwu dróg rozwojowych, są produkty genów *cl* i *cro*. Białka te są represorami transkrypcji i wzajemny ich stosunek ilościowy w zakażonej komórce decyduje o wejściu faga w cykl lityczny bądź lizogeniczny. Represor CI negatywnie reguluje transkrypcję z głównych promotorów cyklu litycznego (p_R i p_L) uniemożliwiając ekspresję większości genów faga. Jednocześnie CI aktywuje ekspresję swojego własnego genu (przez stymulację transkrypcji z promotora p_M), co zapewnia stabilne utrzymywanie się profaga podczas cyklu lizogenicznego. Represor Cro jest natomiast negatywnym regulatorem aktywności promotora p_M zapobiegając tym samym ekspresji genu *cl* i stymulując rozwój lityczny. Ponieważ gen *cro* znajduje się pod kontrolą promotora p_R , obydwa wyżej opisane represory działają antagonistycznie i hamują nawzajem ekspresję genu "konkurenta" (rys. 1). W krótkim czasie po wprowadzeniu materiału genetycznego faga λ do komórki gospodarza rozpoczyna się transkrypcja z dwóch tzw. wczesnych promotorów: p_R i p_L . Aktywność promotora p_R pozwala na ekspresję genu *cro* (rys. 1). Częstość inicjacji transkrypcji z promotora p_M jest natomiast bardzo niewielka przy braku aktywacji przez białko CI, zatem ekspresja genu *cl* we wczesnych etapach rozwoju faga jest uzależniona od aktywności innego promotora, zwanego p_E . Promotor ten jest z kolei aktywowany przez białko CII, którego gen leży za genem *cro* (w tym samym operonie). Ponieważ promotor p_E jest nieaktywny bez białka CII, poziom białka CI w fazie podejmowania decyzji "liza czy lizogenizacja" jest zależny bezpośrednio od aktywności CII. Wydaje się zatem, że o wejściu faga w cykl lityczny bądź lizogeniczny decyduje bezpośrednio poziom aktywatora CII w zakażonej komórce. Białko to, oprócz pozytywnej regulacji ekspresji genu *cl*, aktywuje dwa inne promotory: p_I i p_{aQ} . Aktywność promotora p_I umożliwia ekspresję genu *int*, kodującego integrazę – enzym niezbędny do re-



kombinacji miejscowo-specyficznej pomiędzy genomem faga i chromosomem gospodarza i utworzenia profaga. Transkrypcja rozpoczynająca się z promotora p_{aQ} prowadzi do powstania RNA antysensownego w stosunku do mRNA genu Q , uniemożliwiając pośrednio ekspresję tzw. późnych genów faga (czyli genów główki i ogonka oraz genów kodujących białka niezbędne do lizy komórki gospodarza), która z oczywistych względów byłaby niekorzystna podczas cyklu lizogenicznego.

W jaki sposób poziom białka CII może być regulowany w zależności od czynników środowiskowych i stanu fizjologicznego komórki? CII jest białkiem bardzo niestabilnym, degradowanym przez komórkową proteazę HflB (zwaną też FtsH). Wewnątrzkomórkowa aktywność tej proteazy spada wraz ze wzrostem stężenia cyklicznego AMP (cAMP), nukleotydu produkowanego m.in. w odpowiedzi na ubogie warunki wzrostowe bakterii. Zatem głód komórek gospodarza powoduje pośrednio mniej wydajną degradację CII faworyzując cykl lizogeniczny. Białko CII wykazuje tym mniejszą stabilność, im wyższa jest temperatura (w zakresie od 20 do 42°C), czyli w podwyższonej temperaturze prawdopodobieństwo cyklu litycznego wzrasta. Aktywność proteazy HflB jest także hamowana przez produkt fagowego genu *cIII* (rys. 1). Im więcej fagów zakaża jednocześnie komórkę gospodarza, tym więcej kopii genu *cIII* i więcej białka CIII znajduje się w komórce. Zatem w warunkach zakażenia jednej komórki *E. coli* wieloma fagami λ aktywność proteazy HflB jest niska, co powoduje stabilizację białka CII i rozpoczęcie cyklu lizogenicznego.

Jak wspomniano wyżej, dobre warunki wzrostu komórek gospodarza, stosunkowo wysoka temperatura oraz zakażenie jednej komórki jednym lub niewieloma fagami dają w rezultacie niski poziom białka CII w komórce i powodują rozpoczęcie cyklu litycznego. Do wytworzenia fagów potomnych (podczas typowego cyklu litycznego

Rys. 1. Uproszczona mapa genetyczna bakteriofaga λ wraz ze schematem regulacji na etapie decyzji "liza czy lizogenizacja" oraz efektami systemów antyterminacji zależnych od białek N i Q na transkrypcję głównych rejonów genomu faga. W górnej części rysunku przedstawiona jest mapa genetyczna faga λ (długość liniowego genomu, który ulega cykularyzacji po wnikięciu do komórki *Escherichia coli*, wynosi 48502 pary nukleotydów) z uwzględnieniem najważniejszych genów. Zaznaczono rejonu genomu, w których zlokalizowane są geny kodujące białka biorące udział w różnych procesach podczas cyklu rozwojowego faga (morfogeneza główki i ogonka, rekombinacja genetyczna, wczesna i późna regulacja ekspresji genów, replikacja DNA, liza komórki gospodarza). Główne transkrypty zaznaczone są strzałkami, a położenie głównych terminatorów oznaczono na odpowiednich transkryptach pionowymi kreskami. Skala umieszczona na samej górze rysunku jest przedstawiona w tysiącach par nukleotydów. Odcinki genomu zaznaczone grubymi kreskami są powiększone w środkowej części rysunku (ta część schematu nie jest przedstawiona w skali). Przedstawiono promotory oraz regulację ich aktywności; aktywację przez czynniki transkrypcyjne zaznaczono grubymi strzałkami, a represję oznaczono tępo zakończonymi liniami. Inhibicję aktywności białek również oznaczono tępo zakończonymi liniami. Dolna część schematu obrazuje transkrypcję rejonów genomu faga λ przedstawionych w środkowej części rysunku podczas obecności systemów antyterminacyjnych zależnych od białek N i Q (+N i +Q) oraz przy ich braku (-N i -Q). W dolnej części rysunku zaznaczono położenie głównych promotorów i terminatorów transkrypcji oraz sekwencji *nutL*, *nutR* i *qut*. Dokładniejszy opis mechanizmów regulacyjnych przedstawionych na tym schemacie znajduje się w tekście.

tworzy się 100–200 fagów w jednej zakażonej komórce) konieczna jest ekspresja większości genów wirusa. Jednakże polimeraza RNA rozpoczynająca transkrypcję z promotorów p_R i p_L napotyka wkrótce na sekwencje terminatorów, odpowiednio t_{R1} i t_{L1} , co powodowałoby bardzo wczesne zakończenie transkrypcji. Wprawdzie terminator t_{R1} należy do słabych terminatorów, zależnych od funkcji białka ρ , ale cząsteczki polimerazy RNA, które nie rozpoznają tego sygnału natrafiają wkrótce (po transkrypcji genów białek replikacyjnych) na silny terminator t_{R2} (rys. 1). Co prawda taka szybka terminacja transkrypcji jest korzystna podczas cyklu lizogenicznego (proszę zwrócić uwagę, że tuż po infekcji wczesna transkrypcja zawsze rozpoczyna się z promotorów p_R i p_L niezależnie od tego, czy wybrany będzie rozwój lityczny czy lizogeniczny), ale aby zapewnić pełny cykl lityczny konieczne jest umożliwienie ekspresji genów zlokalizowanych za terminatorami t_{R1} , t_{R2} , t_{L1} i innymi, położonymi bardziej dystalnie w stosunku do promotorów. Ekspresja ta jest możliwa dzięki mechanizmowi antyterminacji transkrypcji. Produkt fagowego genu N , wraz z kilkoma białkami komórkowymi, tworzy kompleks z polimerazą RNA powodując taką zmianę enzymu, że przestaje on rozpoznawać sygnały terminacyjne (rys. 1). Kompleksy takie tworzą się podczas transkrypcji w miejscach zwanych *nut* (*nutR* i *nutL*), położonych pomiędzy promotorami (p_R i p_L) a terminatorami (t_{R1} i t_{L1}). Raz uformowany kompleks antyterminacyjny działa nie tylko w obszarze najbliższego terminatora, ale zapobiega także zakończeniu transkrypcji nawet w rejonach terminatorów oddalonych o kilka tysięcy par zasad od miejsc *nut*. Ma to znaczenie nie tylko w umożliwieniu ekspresji wszystkich genów niezbędnych w cyklu litycznym, ale także np. w regulacji ekspresji genu *int*. Gen ten koduje integrazę, która jest niezbędna podczas cyklu lizogenicznego, ale aktywność tego enzymu, powodującego integrację genomu faga z chromosomem gospodarza, byłaby niepożądana w trakcie rozwoju litycznego. Gdy wybrana zostaje droga lizogeniczna, transkrypcja genu *int* odbywa się z promotora p_I , aktywowanego przez białko CII i kończy się na terminatorze t_I , położonym tuż za genem *int* (rys. 1). W tych warunkach transkrypcja z promotora p_L (a zatem także ekspresja genu N) jest zahamowana przez represor CI. Umożliwia to efektywną produkcję integrazy. Jednakże podczas rozwoju litycznego transkrypcja genu *int* możliwa jest także z aktywnego w tych warunkach promotora p_L . Mimo tego nie dochodzi do efektywnej produkcji integrazy, gdyż utworzenie kompleksu antyterminacyjnego w rejonie *nutL* powoduje, że transkrypcja nie zatrzymuje się na terminatorze t_I , a przechodzi dalej, w rejon zwany *sib* (rys. 1); po transkrypcji tego rejonu, powstały RNA tworzy strukturę drugorzędową rozpoznawaną przez RNazę III, co doprowadza do bardzo szybkiej degradacji mRNA genu *int*. Taki mechanizm kontroli ekspresji genu *int* zwany jest retroregulacją.

Obok systemu antyterminacji transkrypcji zależnego od aktywności białka N , u bakteriofaga λ istnieje drugi system antyterminacyjny, w którym główną rolę odgrywa produkt genu Q . Jest to również białko modyfikujące aktywność polimerazy

RNA w ten sposób, że nie kończy ona transkrypcji w rejonach terminatorów. System ten jest odpowiedzialny za umożliwienie transkrypcji tzw. późnych genów faga, czyli genów kodujących białka kapsydu (główki i ogonka) oraz białka powodujące lizę komórki gospodarza. Transkrypcja ta rozpoczyna się z promotora p_R , i przy barku białka Q kończy się bardzo szybko na terminatorze $t_{R'1}$. Białko Q łączy się z sekwencją DNA zwaną *quit* (rys. 1) położoną w pobliżu p_R , co umożliwia jego oddziaływanie z polimerazą RNA, a następnie antyterminację transkrypcji. Gen *Q* jest transkrybowany z promotora p_R , zatem do wydajnej ekspresji wymaga on wcześniejszej antyterminacji zależnej od białka N (rys. 1). Ponieważ ekspresja genów kodujących białka odpowiedzialne za lizę komórki gospodarza byłaby wyjątkowo niekorzystna podczas cyklu lizogenicznego, istnieje dodatkowe zabezpieczenie przed produkcją białka Q w tych warunkach. Aktywacja promotora p_{aQ} przez białko CII prowadzi do wytworzenia RNA antysensownego do mRNA genu *Q*, co zapobiega jego translacji.

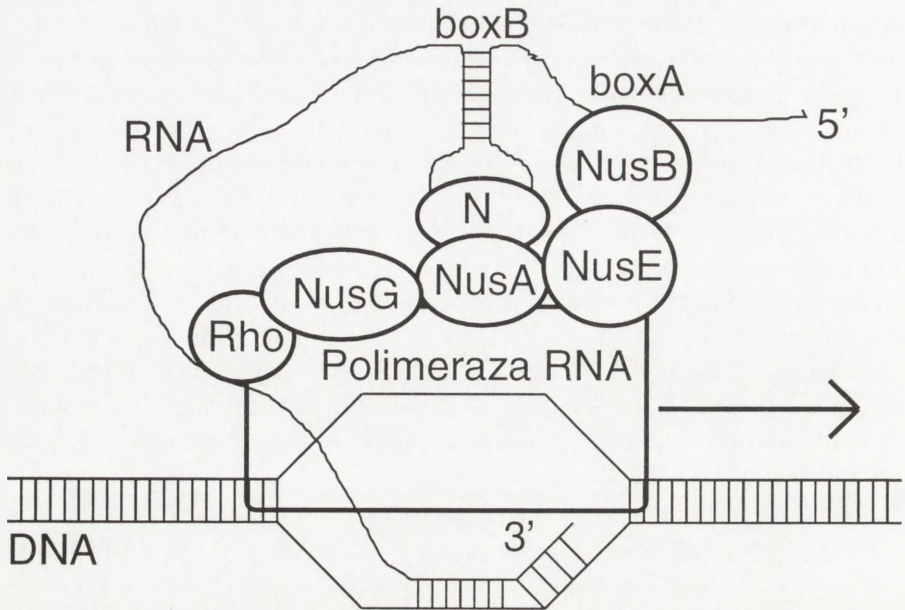
Poniżej przedstawione zostaną mechanizmy antyterminacji zależne od białek N i Q oraz funkcje poszczególnych białek w kompleksach antyterminacyjnych.

3. ANTYTERMINACJA TRANSKRYPCJI ZALEŻNA OD BIAŁKA N

Białko N jest jedynym białkiem kodowanym przez genom faga niezbędnym w antyterminacji transkrypcji jego wczesnych operonów. Do utworzenia kompleksu antyterminacyjnego niezbędne są jednakże białka gospodarza zwane czynnikami Nus oraz specyficzna struktura RNA. Poniżej omówiona jest rola poszczególnych tych czynników.

3.1. Kompleks antyterminacyjny i rejon *nut*

Do utworzenia specyficznego kompleksu antyterminacyjnego z polimerazą RNA konieczne są: białko N oraz komórkowe białka NusA [46], NusB, NusE i NusG [27]. Kompleks taki może być złożony tylko w obecności specyficznej struktury RNA powstałej po transkrypcji rejonu *nut* (*nutR* lub *nutL*). W strukturze tej wyróżnia się dwa rejony, zwane "boxA" i "boxB" [8]. Odcinek RNA zwany "boxB" tworzy strukturę "szpilki do włosów", z którą bezpośrednio oddziałuje białko N [5]. Białko NusA prawdopodobnie pośredniczy w kontaktowaniu się białka N z polimerazą RNA, być może oddziałując także z "boxB" [5, 10, 29]. Z rejonem "boxA" łączy się białko NusB [32], zaś NusE oddziałuje równocześnie z NusB i polimerazą RNA [28, 29]. Dodatkowym czynnikiem stabilizującym kompleks antyterminacyjny jest białko NusG, oddziałujące z polimerazą RNA [29, 43]. Sugeruje się także,



Rys. 2. Komplex antyterminacyjny tworzony z udziałem fagowego białka N oraz czynników komórkowych podczas transkrypcji rejonu *nut*. Oznaczono wszystkie białka biorące udział w formowaniu kompleksu, odcinek transkrybowanego DNA oraz fragment powstającego w wyniku transkrypcji RNA (zaznaczono końce 5' i 3') z rejonami zwanymi "boxA" i "boxB". Kierunek przesuwania się polimerazy RNA po matrycy DNA pokazany jest strzałką. Schemat nie jest przedstawiony w skali

że elementem tego kompleksu może być także białko ρ , oddziałując bezpośrednio z NusG [13, 21, 22]. Komplex antyterminacyjny formowany w rejonie *nut* jest schematycznie przedstawiony na rysunku 2.

Wyżej opisany kompleks antyterminacyjny jest największym znanym prokaryotycznym kompleksem transkrypcyjnym [37]. Raz utworzony kompletny kompleks jest w stanie zapewnić antyterminację nie tylko w obrębie najbliższej położonego terminatora, lecz także (posuwając się cały czas wraz z polimerazą RNA) w rejonach terminatorów (zarówno słabych, jak i silnych) oddalonych od sekwencji *nut* o kilka tysięcy par zasad [13, 27]. Wydaje się, że czynniki Nus są niezbędne głównie do zapewnienia stabilności tego kompleksu, jako że antyterminacja w niewielkich odległościach (od kilkudziesięciu do kilkuset par zasad) od miejsca *nut* możliwa jest *in vitro* w obecności jedynie białek N i NusA [10, 46], a nawet samego białka N, jeśli występuje ono w mieszaninie reakcyjnej w dużym stężeniu [10, 35].

3.2. Białko N

Białko N, jak wyżej opisano, jest czynnikiem absolutnie niezbędnym do antyterminacji transkrypcji rozpoczynającej się z promotorów p_R i p_L , zarówno *in vivo*

jak i *in vitro*, oddziałując bezpośrednio ze strukturą "boxB" RNA powstałego po transkrypcji rejonów *nutR* i *nutL* [5]. Białko to jest kodowane przez gen *N* znajdujący się pod kontrolą promotora p_L . Jest ono białkiem niestabilnym w komórce *E. coli*, degradowanym przez proteazę *lon* [15].

3.3. Białka Nus

Do wydajnej antyterminacji transkrypcji zależnej od białka N niezbędne są białka kodowane przez genom *E. coli*, zwane czynnikami Nus [13]. Zostały one wykryte przez izolację mutantów (zwanymi *nus*) defektywnych w antyterminacji transkrypcji. Mutacje *nusC60*, *nusD026* i *nusE71* okazały się allelami wcześniej znanych genów, odpowiednio: *rpoB* (kodującego podjednostkę β polimerazy RNA), *rho* (kodującego białkowy czynnik terminacji transkrypcji – ρ) i *rpsJ* (kodującego rybosomalne białko S10) [13, 43].

3.3.1. NusA

Czynnik NusA może spełniać dwie przeciwstawne funkcje w komórkach *E. coli*. Bierze on bowiem udział w antyterminacji transkrypcji, ale jest równocześnie białkiem wzmagającym efektywność terminacji transkrypcji w przypadku tych operonów, gdzie nie występuje antyterminacja. NusA łączy się z rdzeniem polimerazy zaraz po rozpoczęciu transkrypcji i oddysocjowaniu czynnika σ , powodując zmniejszenie szybkości elongacji transkrypcji oraz zapewniając sprzężenie transkrypcji z translacją [9]. Mutanty wykazujące brak funkcji *nusA* są żywotne jedynie wtedy, kiedy upośledzona jest równocześnie funkcja czynnika ρ [49]. Pierwszy wyizolowany mutant w genie *nusA* (*nusA1*) wykazuje defekt jedynie w antyterminacji transkrypcji w podwyższonej temperaturze, jednak zmutowane komórki rosną normalnie [7].

3.3.2. NusB

NusB jest białkiem bezpośrednio oddziałującym z rejonem "boxA" podczas antyterminacji transkrypcji [32]. Białko to wydaje się odgrywać rolę zarówno w transkrypcji, jak i w translacji [7]. Oddziałuje ono bowiem bezpośrednio z rybosomalnym białkiem S10 [28, 29] i mimo że nie jest stałym składnikiem rybosomu, mutanty *nusB* wykazują zmniejszone tempo translacji [44].

3.3.3. NusE

Mutacja określana jako *nusE71*, która powoduje zaburzenia antyterminacji transkrypcji w podwyższonej temperaturze, okazała się być allelem genu *rpsJ* kodującego rybosomalne białko S10 [7]. Zatem podobnie jak białko NusB, czynnik NusE (białko S10) pełni rolę zarówno w transkrypcji, jak i w translacji. Podczas antyterminacji transkrypcji oddziałuje ono z NusB oraz polimerazą RNA [29].

3.3.4. NusG

Gen *nusG* został zidentyfikowany dzięki wyizolowaniu mutantu supremującego defekt w antyterminacji transkrypcji spowodowany mutacją *nusA1* [43]. NusG wykazuje słabe oddziaływanie z rdzeniem polimerazy RNA [26] i zwiększa szybkość elongacji transkrypcji [4]. Wykazano, że białko NusG oddziałuje z czynnikiem terminacyjnym ρ i jest konieczne do efektywnej terminacji transkrypcji w rejonach słabych, tzw. ρ -zależnych, terminatorów [3, 21, 22, 42].

3.4. Polimeraza RNA

Do niedawna bardzo niewiele było wiadomo o funkcji poszczególnych podjednostek polimerazy RNA w antyterminacji transkrypcji. Wyizolowanie mutantów supremujących defekt antyterminacji spowodowany mutacją *nusA1* i zmapowanie tych supresorowych mutacji w genach *rpoB* i *rpoC* może sugerować oddziaływania NusA z podjednostką β i/lub β' polimerazy RNA [20, 40]. Ostatnio opublikowane prace zwracają jednak uwagę na rolę podjednostki α w antyterminacji transkrypcji. Okazuje się, że podjednostka α może oddziaływać z nowo powstającym podczas transkrypcji *in vitro* łańcuchem RNA, a oddziaływania te są znoszone przez białko NusA [24]. Ponadto wyizolowano mutanty w genie *rpoA* (kodującym podjednostkę α), które wpływają na wydajność antyterminacji transkrypcji. Są to mutanty: *rpoAD305E*, który zwiększa efektywność antyterminacji transkrypcji zależnej od białka N i znosi negatywny efekt mutacji *nusA1*, *nusB5* i *nusE71* [39] i *rpoA341*, który wywołuje obniżoną wydajność antyterminacji i potęguje efekty mutacji *nusA1*, *nusB5* i *nusE71*, które w tym przypadku są widoczne już w 30°C bądź w 37°C, a nie tylko w 43°C [31]. Obydwie wyżej wspomniane mutacje powodują zmiany pojedynczych aminokwasów w C-terminalnej domenie podjednostki α . Te wyniki mogłyby sugerować bezpośrednie oddziaływanie podjednostki α z czynnikiem Nus. Jednakże rezultaty innych eksperymentów, wykazujące że efekty mutacji *nus* mogą być częściowo supremowane także przez delecję C-terminalnej domeny podjednostki α [39] oraz że zależna od białka N antyterminacja transkrypcji *in vitro* zachodzi efektywnie w obecności polimerazy RNA pozbawionej C-terminalnej domeny podjednostki α [25], wskazują na inny mechanizm. Zaproponowano istnienie hipotetycznego inhibitora antyterminacji transkrypcji, który oddziaływałby z podjednostką α polimerazy RNA [13, 39]. Mutant *rpoA* wykazujący zwiększoną wydajność antyterminacji transkrypcji (*rpoAD305E*) odznaczałby się zatem zmniejszonym powinowactwem podjednostki α do inhibitora, zaś mutacja w genie *rpoA* zmniejszająca efektywność antyterminacji (*rpoA341*) powodowałaby silniejsze oddziaływanie podjednostki α z inhibitorem [13, 31, 39].

4. ANTYTERMINACJA TRANSKRYPCJI W OPERONACH *rrn*

Mechanizm antyterminacji transkrypcji przypominający nieco proces zależny od białka N został wykryty w operonach *E. coli* kodujących rRNA. Te same czynniki Nus (NusA, NusB, NusE i NusG) są niezbędne do efektywnej antyterminacji *in vitro* w obu systemach [41]. Istnieją jednakże istotne różnice pomiędzy nimi. Po pierwsze, nie jest znany komórkowy analog białka N bakteriofaga λ . Po drugie, w odróżnieniu od miejsc *nutR* i *nutL*, rejon liderowy powstający podczas transkrypcji operonów *rrn* zawiera sekwencję bardzo przypominającą "boxA", ale nie zawiera "boxB" [2]. Po trzecie, antyterminacja w obrębie operonów *rrn* jest skuteczna jedynie w przypadku terminatorów słabych, tzw. ρ -zależnych, podczas gdy antyterminacja z udziałem białka N zachodzi w rejonach terminatorów zarówno słabych, jak i silnych [1]. Ponadto wydaje się, że do skutecznej antyterminacji w operonach *rrn* wymagany jest przynajmniej jeden dodatkowy, dotychczas niezidentyfikowany czynnik [41]. Wyniki ostatnich doświadczeń wskazują, że modyfikacja polimerazy RNA z wykorzystaniem sekwencji "boxA" podczas transkrypcji operonów *rrn* jest wystarczająca do antyterminacji transkrypcji w rejonie pierwszego ρ -zależnego terminatora, jednakże w przeciwieństwie do systemu zależnego od białka N, przejście transkrypcji przez rejon następnego terminatora wymaga dodatkowego "boxA" (położonego pomiędzy pierwszym terminatorem a następnym) i "odnowienia" kompleksu antyterminacyjnego [33].

5. ANTYTERMINACJA TRANSKRYPCJI ZALEŻNA OD BIAŁKA Q

Drugim systemem antyterminacyjnym bakteriofaga λ jest mechanizm zależny od funkcji białka Q. Ostateczny efekt działania tego systemu jest analogiczny jak w przypadku antyterminacji zależnej od białka N – nierozpoznawanie przez zmodyfikowaną polimerazę RNA zarówno słabych, jak i silnych terminatorów oddalonych nawet kilka tysięcy par zasad od miejsca utworzenia kompleksu antyterminacyjnego. Jednakże mechanizm działania białka Q jest znacząco różny od białka N. Produkt genu *Q* wiąże się z sekwencją DNA zwaną *gut* [48], podczas gdy, jak to opisano powyżej, białko N oddziałuje z RNA w rejonie "boxB". Sekwencja *gut* zlokalizowana jest tuż za promotorem $p_{R'}$ [48]. Przy braku białka Q transkrypcja rozpoczynająca się z $p_{R'}$ kończy się bardzo szybko, w odległości zaledwie kilkunastu (16 lub 17) nukleotydów od miejsca inicjacji, w rejonie terminatora $t_{R'1}$ [18]. W przeciwieństwie do systemu zależnego od białka N, antyterminacja transkrypcji

stymulowana przez białko Q wymaga tylko jednego dodatkowego czynnika białkowego – NusA [18]. Proces ten może się zatem wydawać zbliżony do mechanizmu antyterminacji transkrypcji *in vitro*, w którym obok polimerazy RNA obecne były jedynie białka N i NusA lub tylko białko N. Należy jednak pamiętać, że wspomniane reakcje *in vitro* pozwalają na antyterminację jedynie na krótkich odcinkach, podczas gdy modyfikacja polimerazy RNA przez białka Q i NusA w rejonie sekwencji *qut* powoduje powstanie trwałego kompleksu antyterminacyjnego.

Istnieje bardzo mało danych na temat roli poszczególnych podjednostek polimerazy RNA w antyterminacji transkrypcji zależnej od białka Q. Ostatnio wykazano, że usunięcie C-terminalnej domeny podjednostki α znacznie obniża wydajność antyterminacji transkrypcji w rejonie $t_{R'}_1$ *in vitro* [25]. Może to sugerować oddziaływanie bądź białka Q, bądź czynnika NusA z tą podjednostką. Należy jednak przypomnieć, że mimo iż niektóre doświadczenia biochemiczne sugerują oddziaływanie NusA z podjednostką α [24, 25], to istnieją dane zarówno genetyczne, jak i pochodzące z eksperymentów *in vitro* wskazujące na bezpośredni kontakt białka NusA z podjednostkami β i β' [20, 25, 40].

6. UWAGI KOŃCOWE

Przedstawione w tym artykule procesy antyterminacji transkrypcji u bakteriofaga λ są co prawda najlepiej poznanymi mechanizmami antyterminacyjnymi, niemniej zarówno w przypadku systemu zależnego od białka N, jak i systemu zależnego od białka Q pozostaje wiele niewyjaśnionych problemów. Do najważniejszych z nich należy niewątpliwie pytanie, jakie zmiany zachodzące w strukturze polimerazy RNA podczas jej modyfikacji w kompleksie antyterminacyjnym pozwalają na kontynuowanie transkrypcji przez rejony terminatorów. Na weryfikację oczekuje także hipoteza zakładająca istnienie specyficznego inhibitora antyterminacji transkrypcji zależnej od białka N. Dokładniejsze zbadanie mechanizmów antyterminacji transkrypcji wydaje się mieć duże znaczenie, jako że ten sposób regulacji ekspresji genów występuje nie tylko u bakteriofaga λ , lecz także odgrywa istotną rolę w komórkach bakteryjnych oraz podczas rozwoju niektórych wirusów (np. HIV) zakażających komórki eukariotyczne.

LITERATURA

- [1] ALBRECHTSEN B, SQUIRES CL, LI S, SQUIRES C. Antitermination of characterized transcriptional terminators by the *Escherichia coli* *rrnG* leader region. *J Mol Biol* 1990; **213**: 123–134.

- [2] BERG KL, SQUIRES C, SQUIRES CL. Ribosomal RNA operon antitermination: function of leader and spacer region boxB-boxA sequences and their conservation in diverse micro-organisms. *J Mol Biol* 1989; **209**: 345–358.
- [3] BUROVA E, GOTTESMAN ME. NusG overexpression inhibits Rho-dependent termination in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 1995; **17**: 633–641.
- [4] BUROVA E, HUNG SC, SAGITOV V, STITT BL, GOTTESMAN ME. *Escherichia coli* NusG protein stimulates transcription elongation rates *in vivo* and *in vitro*. *J Bacteriol* 1995; **177**: 1388–1392.
- [5] CHATTOPADHYAY S, GARCIA-MENA J, DeVITO J, WOLSKA K, DAS A. Bipartite function of a small RNA hairpin in transcription antitermination in bacteriophage lambda. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; **92**: 4061–4065.
- [6] CONDON C, SQUIRES C, SQUIRES CL. Control of rRNA transcription in *Escherichia coli*. *Microbiol Rev* 1995; **59**: 623–645.
- [7] COURT DL, PATTERSON TA, BAKER T, COSTANTINO N, MAO X, FRIEDMAN DI. Structural and functional analysis of the transcription-translation proteins NusB and NusE. *J Bacteriol* 1995; **177**: 2589–2591.
- [8] DAS A. How the phage lambda *N* gene product suppresses transcription termination: communication of RNA polymerase with regulatory proteins mediated by signals in nascent RNA. *J Bacteriol* 1992; **174**: 6711–6716.
- [9] DAS A, WOLSKA K. Transcription antitermination *in vitro* by lambda *N* gene product: requirement for a phage *nut* site and the products of host *nusA*, *nusB* and *nusE* genes. *Cell* 1984; **38**: 165–173.
- [10] DeVITO J, DAS A. Control of transcription processivity in phage lambda: Nus factors strengthen the termination-resistant state of RNA polymerase induced by *N* antiterminator. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; **91**: 8660–8664.
- [11] ECHOLS H. Bacteriophage λ development: temporal switches and the choice of lysis or lysogeny. *Trends Genet* 1986; **2**: 26–30.
- [12] ECHOLS H, GUARNEROS G. Control of integration and excision. [w] Hendrix RW, Roberts JW, Stahl FW, Weisberg RA [red.] Lambda II. Cold Spring Harbor Laboratory, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press 1983: 75–92.
- [13] FRIEDMAN DI, COURT DL. Transcription antitermination: the λ paradigm updated. *Mol Microbiol* 1995; **18**: 191–200.
- [14] FRIEDMAN DI, GOTTESMAN M. Lytic mode of lambda development. [w] Hendrix RW, Roberts JW, Stahl FW, Weisberg RA [red.] Lambda II. Cold Spring Harbor Laboratory, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press 1983: 21–51.
- [15] GOTTESMAN S, GOTTESMAN M, SHAW JE, PEARSON ML. Protein degradation in *E. coli*: the *lon* mutation and bacteriophage lambda *N* and *cII* stability. *Cell* 1981; **24**: 225–233.
- [16] GOURSE RL, deBOER HA, NOMURA M. DNA determinants of rRNA synthesis in *E. coli*: growth rate dependent regulation, feedback inhibition, upstream activation, antitermination. *Cell* 1986; **44**: 197–205.
- [17] GRAEBLE MA, CHURCHEL MJ, LOWE AD, GAIT MJ, KARN J. Human immunodeficiency virus type I transactivator protein, Tat, stimulates transcriptional read-through of distal terminator sequences *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; **90**: 6184–6188.
- [18] GRAYHACK EJ, YANG XJ, LAU LF, ROBERTS JW. Phage lambda gene Q antiterminator recognizes RNA polymerase near the promoter and accelerates it through a pause site. *Cell* 1985; **42**: 259–269.
- [19] GUSSIN GN, JOHNSON AD, PABO CO, SAUER RT. Repressor and Cro protein: structure, function, and role in lysogenization. [w] Hendrix RW, Roberts JW, Stahl FW, Weisberg RA [red.] Lambda II. Cold Spring Harbor Laboratory, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press 1983: 93–121.

- [20] ITO K, EGAWA K, NAKAMURA Y. Genetic interaction between the beta' subunit of RNA polymerase and the arginine-rich domain of *Escherichia coli* NusA protein. *J Bacteriol* 1991; **173**: 1492–1501.
- [21] LI J, HORWITZ R, McCracken S, GREENBLATT J. NusG, a new *Escherichia coli* elongation factor involved in transcriptional antitermination by the N protein of phage λ . *J Biol Chem* 1992; **267**: 6012–6019.
- [22] LI J, MASON SW, GREENBLATT J. Elongation factor NusG interacts with termination factor ρ to regulate termination and antitermination. *Genes Dev* 1993; **7**: 161–172.
- [23] LI SC, SQUIRES CL, SQUIRES C. Antitermination of *E. coli* rRNA transcription is caused by a control region segment containing lambda *nut*-like sequences. *Cell* 1984; **38**: 851–860.
- [24] LIU K, HANNA MM. NusA interferes with interactions between the nascent RNA and the C-terminal domain of the α subunit of RNA polymerase in *Escherichia coli* transcription complexes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; **92**: 5012–5016.
- [25] LIU K, ZHANG Y, SEVERINOV K, DAS A, HANNA MM. Role of *Escherichia coli* RNA polymerase alpha subunit in modulation of pausing, termination and anti-termination by the transcription elongation factor NusA. *EMBO J* 1996; **15**: 150–161.
- [26] MASON SW, GREENBLATT J. Assembly of transcription elongation complex containing the N protein of phage λ and the *Escherichia coli* elongation factors NusA, NusB, NusG and S10. *Gene Dev* 1991; **5**: 1504–1512.
- [27] MASON SW, LIJ, GREENBLATT J. Host factor requirements for processive antitermination of transcription and suppression of pausing by the N protein of bacteriophage λ . *J Biol Chem* 1992; **267**: 19418–19426.
- [28] MASON SW, LI J, GREENBLATT J. Direct interaction between two *Escherichia coli* transcription antitermination factors, NusB and ribosomal protein S10. *J Mol Biol* 1992; **223**: 55–66.
- [29] MOGRIDGE J, MAH T-F, GREENBLATT J. A protein-RNA interaction network facilitates the template-independent cooperative assembly on RNA polymerase of a stable antitermination complex containing the λ N protein. *Genes Dev* 1995; **9**: 2831–2844.
- [30] MORGAN EA. Antitermination mechanism in rRNA operons of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 1986; **168**: 1–5.
- [31] OBUCHOWSKIM, WĘGRZYNA, SZALEWSKA-PALASZA, THOMAS MS, WĘGRZYN G. An RNA polymerase α subunit mutant impairs N-dependent transcriptional antitermination in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 1997; **23**: 211–222.
- [32] PATTERSON TA, ZHANG Z, BAKER T, JOHNSON LL, FRIEDMAN DI, COURT DL. Bacteriophage lambda N-dependent transcription antitermination: competition for an RNA site may regulate antitermination. *J Mol Biol* 1994; **236**: 217–228.
- [33] PFEIFFER T, HARTMANN RK. Role of the spacer boxA of *Escherichia coli* ribosomal RNA operons in efficient 23 S rRNA synthesis *in vivo*. *J Mol Biol* 1997; **265**: 385–393.
- [34] PTASHNE M. A Genetic Switch: Bacteriophage λ and Higher Organisms. Cambridge, Massachusetts: Cell Press and Blackwell Scientific Publications 1992.
- [35] REES WA, WEITZEL SE, YAGER TD, DAS A, von HIPPEL P. Bacteriophage λ N protein alone can induce transcription antitermination *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; **93**: 342–346.
- [36] ROBERTS JW. Termination factor of RNA synthesis. *Nature* 1969; **224**: 1168–1174.
- [37] ROBERTS JW. RNA and protein elements of *E. coli* and λ transcription antitermination complexes. *Cell* 1993; **72**: 653–655.
- [38] RUTBERG B. Antitermination of transcription of catabolic operons. *Mol Microbiol* 1997; **23**: 413–421.
- [39] SCHAUER AT, CHENG S-WC, ZHENG C, SiPIERRE L, ALESSI D, HIDAYETOGLU DL, COSTANTINO N, COURT DL, FRIEDMAN DI. The alpha subunit of RNA polymerase and transcription antitermination. *Mol Microbiol* 1996; **21**: 839–851.

- [40] SPARKOWSKI J, DAS A. Simultaneous gain and loss of functions caused by a single amino acid substitution in the beta subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase: suppression of *nusA* and *rho* mutations and conditional lethality. *Genetics* 1992; **130**: 411–428.
- [41] SQUIRES CL, GREENBLATT J, LI J, CONDON C, SQUIRES CL. Ribosomal RNA antitermination *in vitro*: requirement for Nus factors and one or more unidentified cellular components. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; **90**: 970–974.
- [42] SULLIVAN SL, GOTTESMAN ME. Requirement for *E. coli* NusG protein in factor-dependent transcription termination. *Cell* 1992; **68**: 989–994.
- [43] SULLIVAN SL, WARD DF, GOTTESMAN ME. Effect of *Escherichia coli* *nusG* function on λ N-mediated transcription antitermination. *J Bacteriol* 1992; **174**: 1339–1344.
- [44] TAURA T, UEGUCHI C, SHIBA K, ITO K. Insertional disruption of the *nusB* (*ssyB*) gene leads to cold-sensitive growth of *Escherichia coli* and suppression of the *secY24* mutation. *Mol Gen Genet* 1992; **234**: 429–432.
- [45] TAYLOR K, WĘGRZYN G. Regulation of bacteriophage λ replication. [w] Busby S [red.] Molecular Microbiology (NATO ASI Series). Berlin: Springer Verlag 1997: w druku.
- [46] WHALEN W, GHOSH B, DAS A. NusA protein is necessary and sufficient *in vitro* for phage λ N gene product to suppress a ρ -independent terminator placed downstream of *nutL*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; **85**: 2494–2498.
- [47] WULFF DL, ROSENBERG M. Establishment of repressor synthesis. [w] Hendrix RW, Roberts JW, Stahl FW, Weisberg RA [red.] Lambda II. Cold Spring Harbor Laboratory, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press 1983: 53–73.
- [48] YARNELL WS, ROBERTS JW. The phage lambda gene Q transcriptional antiterminator binds DNA in the late gene promoter as it modifies RNA polymerase. *Cell* 1992; **69**: 1181–1189.
- [49] ZHENG C, FRIEDMAN DI. Reduced Rho-dependent transcription termination permits NusA-independent growth of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; **91**: 7543–7547.

Otrzymano: –

Przyjęto: 24.06. 1997 r.

Adres autora: ul. Kładki 24, 80-822 Gdańsk

AKTYWACJA TRANSKRYPCJI W KOMÓRKACH *ESCHERICHIA COLI**

ACTIVATION OF TRANSCRIPTION IN *ESCHERICHIA COLI*

Grzegorz WĘGRZYN¹, Alicja WĘGRZYN²

¹Uniwersytet Gdański, Katedra Biologii Molekularnej; ²Instytut Biochemii i Biofizyki Polskiej Akademii Nauk, Pracownia Biologii Molekularnej afiliowana przy Uniwersytecie Gdańskim

Streszczenie. Regulacja inicjacji transkrypcji jest najczęściej występującym mechanizmem kontroli ekspresji genów zarówno w komórkach prokariotycznych, jak i eukariotycznych. U bakterii, w przeciwieństwie do organizmów eukariotycznych, kontrola inicjacji transkrypcji polega najczęściej na represji odpowiednich promotorów. Ostatnie badania wykazały jednak, że pozytywna regulacja aktywności promotorów jest także bardzo powszechna w komórkach prokariotycznych. Aktywacja transkrypcji z poszczególnych promotorów w komórkach *Escherichia coli* może odbywać się przez bezpośredni kontakt białka aktywatorowego (wiążącego się z DNA w pobliżu promotora) z polimerazą RNA, dzięki oddziaływaniom podjednostki α polimerazy RNA z sekwencją DNA znajdującą się przed promotorem (z tzw. elementem UP) albo przez działanie tzw. "wzmacniaczy" (*enhancers*) prokariotycznych.

Słowa kluczowe: Regulacja ekspresji genów, aktywacja transkrypcji, polimeraza RNA, *Escherichia coli*

Summary: Regulation of transcription initiation is the most common type of gene expression control in both prokaryotic and eukaryotic cells. In bacteria, contrary to eukaryotes, repression of particular promoters is the most frequently found event in the control of transcription initiation. Recent investigations have shown, however, that positive regulation of promoter activity is also common in prokaryotic cells. Transcription activation in *Escherichia coli* may be achieved by direct contact of an activator protein (bound to DNA close to the promoter) with RNA polymerase, due to interaction of the α subunit of RNA polymerase with the DNA sequence located upstream of the promoter (so called UP element), or by the action of prokaryotic enhancers.

Key words: Regulation of gene expression, transcription activation, RNA polymerase, *Escherichia coli*

*Praca finansowana w ramach grantu KBN (projekt nr 6 P04A 059 09)

1. WSTĘP

Regulacja ekspresji genów jest kluczowym zagadnieniem w biologii molekularnej i biologii komórki w przypadku organizmów zarówno prokariotycznych, jak i eukariotycznych. U obu tych grup najczęstszym sposobem kontroli ekspresji genów jest regulacja częstości inicjacji transkrypcji z poszczególnych promotorów. W komórkach *Eukaryota* rozpoczęcie transkrypcji najczęściej uwarunkowane jest działaniem pozytywnego czynnika regulacyjnego – aktywatora [92]. U bakterii znacznie częściej dochodzi do negatywnej regulacji aktywności promotora przez działanie specyficznego białka represorowego. Niemniej jednak badania ostatnich lat wykazały, że aktywacja transkrypcji jest również częstym mechanizmem kontroli ekspresji genów prokariotycznych [1, 12, 13, 29]. Wśród wszystkich organizmów, zarówno prokariotycznych jak i eukariotycznych, procesy regulacji transkrypcji zostały najlepiej poznane w komórkach *Escherichia coli* [29]. Dlatego też pozytywna regulacja aktywności promotorów będzie w tym artykule omówiona właśnie na przykładzie tej bakterii. W komórkach prokariotycznych aktywacja transkrypcji może odbywać się na trzy sposoby:

- (1) przez bezpośrednie oddziaływanie specyficznego białkowego aktywatora, który wiąże się z DNA w pobliżu promotora, z polimerazą RNA,
- (2) dzięki oddziaływaniom podjednostki α polimerazy RNA z sekwencją bogatą w pary AT, położoną przed promotorem i zwaną elementem UP oraz
- (3) w wyniku aktywności tzw. "wzmacniaczy" (*enhancers*) prokariotycznych [29].

Te trzy sposoby aktywacji transkrypcji zostaną opisane poniżej.

Holoenzym polimerazy RNA *Escherichia coli* składa się z dimeru podjednostki α , podjednostek β i β' oraz jednego z czynników σ ($\alpha_2\beta\beta'\sigma$) [36]. Czynniki σ niezbędny jest jedynie podczas inicjacji transkrypcji, natomiast wydłużanie łańcucha poliribonukleotydowego na matrycy DNA katalizuje rdzeń polimerazy złożony z dimeru podjednostki α oraz podjednostek β i β' ($\alpha_2\beta\beta'$) [69]. Do niedawna nie wiadomo, które z tych podjednostek mogą kontaktować się bezpośrednio z białkami aktywującymi. Ostatnie lata przyniosły wiele dowodów na to, że liczne aktywatory mogą oddziaływać bądź z podjednostką α , bądź z podjednostką σ^{70} [29, 35, 36, 76]. Podjednostka α jest ponadto odpowiedzialna za bezpośredni kontakt z elementem UP [20, 29]. Podczas działania prokariotycznych "wzmacniaczy", bezpośrednio oddziaływania zaobserwowano pomiędzy pozytywnymi regulatorami transkrypcji a podjednostką σ^{54} [29]. Rola poszczególnych podjednostek polimerazy RNA w aktywacji transkrypcji będzie również dyskutowana w kolejnych rozdziałach tego artykułu.

2. PROMOTORY PROKARIOTYCZNE

Typowy promotor funkcjonujący w komórce *Escherichia coli* składa się z dwóch stosunkowo krótkich sekwencji DNA położonych przed miejscem startu transkrypcji [12]. Rejon zwany "TATA-box" (określany również jako "Pribnow-box" lub rejon "-10") zlokalizowany jest około 10 par nukleotydów przed miejscem +1, oznaczającym punkt rozpoczęcia transkrypcji. Sekwencja najwyższej zgodności (*consensus*) "TATA-box" obejmuje 6 nukleotydów: 5'-TATAAT-3'. Odcinek zwany rejonem "-35" położony jest kilkanaście nukleotydów przed "TATA-box" i także obejmuje kilka nukleotydów o sekwencji *consensus* 5'-TTGACA-3'. Należy zauważyć, że podane powyżej sekwencje dotyczą promotorów rozpoznawanych przez holoenzym polimerazy RNA zawierający podjednostkę σ^{70} (czynnik σ biorący udział w inicjacji transkrypcji większości genów *Escherichia coli*). Inne czynniki σ rozpoznają inne sekwencje w obrębie promotorów. Ogólnie przyjmuje się, że w przypadku większości promotorów istnieje zasada, iż siła promotora zależy od zgodności jego rejonów "-10" i "-35" z odpowiednimi sekwencjami *consensus* [12].

W przeciwieństwie do promotorów komórek eukariotycznych konstytutywna transkrypcja rozpoczynająca się z promotorów bakteryjnych nie wymaga dodatkowych czynników poza holoenzymem polimerazy RNA i rejonami "-10" i "-35" [28]. Niemniej jednak w regulację częstości inicjacji transkrypcji z wielu promotorów zaangażowane są białka regulatorowe. Są to zarówno represory, negatywnie regulujące aktywność promotorów, oraz aktywatory, stymulujące inicjację transkrypcji. Niektóre promotory nie wykazują niemal żadnej aktywności bez udziału specyficznych białek aktywatorowych.

3. AKTYWACJA TRANSKRYPCJI PRZEZ ODDZIAŁYWANIE POLIMERAZY RNA Z AKTYWATOREM ZWIĄZANYM Z DNA W POBLIŻU PROMOTORA

Najczęściej występującym sposobem aktywacji transkrypcji jest bezpośrednie oddziaływanie białka aktywatorowego, które wiąże się ze specyficzną sekwencją DNA w pobliżu promotora, z polimerazą RNA. Takie oddziaływanie może stymulować wiązanie się polimerazy RNA do promotora (K_B), izomeryzację, czyli przejście z kompleksu zamkniętego do otwartego (k_f) lub obydwa te procesy [1].

Bakteryjne aktywatory transkrypcji wiążą się najczęściej w niewielkiej odległości od sekwencji promotora (centrum wiązania aktywatora występuje około 60 nukleotydów przed miejscem +1) lub wręcz w obrębie aktywatora (centrum wiązania aktywatora występuje około 40 nukleotydów przed miejscem +1 i pokrywa się częściowo z rejonem "-35") [35, 36]. Do niedawna nie było wiadomo, z jakimi podjednostkami polimerazy RNA mogą oddziaływać poszczególne aktywatory transkrypcji. Pierwsze doniesienia wskazujące na miejsce kontaktu z białkami aktywatorowymi oparte były na izolacji mutantów w genie *rpoA*, które wykazywały specyficzne defekty w aktywacji transkrypcji z niektórych promotorów [35]. Gen *rpoA* koduje podjednostkę α polimerazy RNA, a większość mutacji zaburzających pozytywną kontrolę inicjacji transkrypcji powoduje zmiany aminokwasowe w C-terminalnej domenie tego białka [20, 35, 36]. Potwierdzeniem przypuszczenia, że ten fragment podjednostki α może odgrywać bardzo istotną rolę w kontakcie z aktywatorami były liczne doświadczenia *in vitro*, w których wykorzystano kompleksy polimerazy RNA pozbawione fragmentu C-końcowej tej podjednostki [35, 36].

Wykazanie, że podjednostka α odgrywa istotną rolę w regulacji inicjacji transkrypcji było sporym zaskoczeniem, jako że poprzednio uważano, iż ma ona znaczenie jedynie w składaniu holoenzymu polimerazy RNA i utrzymywaniu integralności tego kompleksu [76]. Tworzenie dimeru α_2 jest bowiem pierwszym etapem montażu kompleksu polimerazy RNA, przebiegającego według następującego schematu: $2\alpha \rightarrow \alpha_2 \rightarrow \alpha\beta \rightarrow \alpha\beta\beta' \rightarrow \alpha\beta\beta'\sigma$ [32]. Podjednostka α składa się z dwu niezależnych domen: N-terminalnej (zwanej w skrócie α NTD) i C-terminalnej (zwanej w skrócie α CTD) połączonych linkerem złożonym z co najmniej kilku aminokwasów [34, 42, 43, 44, 62]. Domena N-końcowa została pierwotnie uznana za pełniącą rolę w dimeryzacji podjednostki α [34], zaś domenie C-terminalnej przypisano rolę w aktywacji transkrypcji [35]. Jednakże później wykazano, że α NTD może także kontaktować się z pozytywnymi regulatorami transkrypcji [13], zaś α CTD jest zdolna do dimeryzacji [9].

Podjednostka α składa się z 329 aminokwasów, z czego na α NTD składają się aminokwasy 1–235, a na α CTD aminokwasy 245–329 [20]. Poznano strukturę III-rzędową α CTD [39]. W jej skład wchodzi cztery α -helisy: H1 (aminokwasy 264–273), H2 (aminokwasy 278–283), H3 (aminokwasy 286–292) i H4 (aminokwasy 297–309). Za oddziaływanie z aktywatorami transkrypcji odpowiedzialne są głównie helisy H1 i H4, które co prawda są znacznie oddalone od siebie, jeśli rozpatrywać strukturę I-rzędową α CTD, jednak w strukturze przestrzennej znajdują się blisko siebie [39].

Najlepiej zbadanym aktywatorem oddziałującym z α CTD jest białko CAP (zwane też CRP). Białko to tworzy kompleks z cyklicznym AMP (cAMP) i w takiej postaci (CAP-cAMP) jest w stanie aktywować ponad 100 różnych promotorów w komórkach *E. coli* [13]. Niespodziewanie okazało się, że występują znaczące różnice w mechanizmie aktywacji różnych promotorów przez CAP-cAMP, a zależą one od miejsca

wiązania się tego aktywatora do DNA w pobliżu promotora. Badania *in vitro* wykazały, że aktywacja tych promotorów, gdzie CAP-cAMP wiąże się przed sekwencją "-35" (czyli w okolicach rejonu -60), takich jak np. promotor *lac* P1, jest absolutnie uzależniona od obecności α CTD, natomiast zależna od CAP-cAMP aktywacja promotorów, w których miejsce wiązania się aktywatora zachodzi na rejon "-35", takich jak promotor *gal* P1, może odbywać przy braku α CTD [35]. Na podstawie tych danych zaproponowano podział promotorów aktywowanych przez CAP na dwie klasy:

I – gdzie aktywator wiąże się przed promotorem i oddziałuje z α CTD i

II – gdzie miejsce wiązania się aktywatora pokrywa się z rejonem "-35" i do aktywacji nie jest wymagana obecność α CTD [36].

Później aktywatory działające w podobny sposób jak CAP w rejonie promotora laktozowego również zaczęto nazywać aktywatorami klasy I [12].

Wykryto wiele przykładów oddziaływania różnych aktywatorów transkrypcji z C-terminalną domeną podjednostki α (tab. 1). Tego typu oddziaływanie aktywatora (związanego z DNA w rejonie -60) z polimerazą RNA stymuluje wiązanie się tego enzymu z sekwencją promotora (K_B) [13]. Pewne wyniki sugerowały, że w przypadku promotorów klasy II miejscem kontaktu białka CAP z polimerazą RNA może być podjednostka σ^{70} [40, 47]. Jednakże ostatnio wykazano, że w tym przypadku aktywator oddziałuje raczej zarówno z α CTD, jak i z α NTD [4, 8, 64, 74, 101, 103]. Co ciekawe, podczas inicjacji transkrypcji z promotorów klasy II domena C-terminalna działa jako inhibitor i oddziaływanie aktywatora z tą domeną ma na celu niwelowanie negatywnego wpływu α CTD [13]. Właściwa aktywacja transkrypcji następuje natomiast podczas oddziaływania aktywatora z α NTD, przy czym stymulowany jest proces izomeryzacji (k_i) bez wpływu na proces wiązania się polimerazy RNA do sekwencji promotora [13]. Ten mechanizm aktywacji tłumaczy także, dlaczego zwiększenie częstości inicjacji transkrypcji z promotorów klasy II zachodzi efektywnie *in vitro* przy zastosowaniu polimerazy RNA pozbawionej α CTD, mimo że CAP-cAMP oddziałuje podczas tego procesu z tą domeną. Oddziaływania te nie są niezbędne do aktywacji, gdyż zapobiegają jedynie negatywnym wpływom α CTD.

Mimo że propozycja oddziaływania białka CAP z podjednostką σ^{70} podczas aktywacji transkrypcji z promotora *gal* P1 [40, 47] spotkała się z poważnymi zastrzeżeniami [13], okazało się, że podjednostka ta może być miejscem kontaktu z innymi pozytywnymi regulatorami transkrypcji [46, 52, 86, 100]. Istnieją także doniesienia, że niektóre aktywatory mogą prawdopodobnie oddziaływać jednocześnie z α CTD i σ^{70} [2, 15]. Zaproponowano również istnienie potencjalnego aktywatora mogącego kontaktować się jednocześnie z trzema miejscami na powierzchni polimerazy RNA: α CTD, α NTD i σ^{70} [13].

Początkowo wydawało się, że wszystkie aktywatory transkrypcji wiążące się z DNA w okolicy -60 wymagają kontaktu z α CTD, natomiast aktywatory wiążące

Tabela 1. Oddziaływanie różnych podjednostek polimerazy RNA z aktywatorami transkrypcji związanymi z DNA w pobliżu aktywowanych promotorów.

Aktywator	Promotor	Podjednostka polimerazy RNA	Literatura
Ada	p_{ada}	α CTD	[77]
AraC	p_{araBAD} , p_{araE}	α CTD	[23, 89]
CAP(CRP)-cAMP	$p_{cc(-41.5)}$	α CTD i α NTD	[64, 101, 103]
	$p_{cc(-61.5)}$	α CTD	[101, 103]
	gal P1	α CTD i α NTD; σ^{70} (?)	[4, 8]; [40, 47]
	lac P1	α CTD	[16, 18, 65, 85, 102, 104]
	$p_{melRcon}$ p_{ML1}	α CTD i α NTD α CTD	[74] [14]
CI (fag λ)	p_M (fag λ)	α CTD (?); σ^{70} ;	[98] [30, 45, 46, 52, 86, 100]
CII (fag λ)	p_E , p_I , p_{aQ} (fag λ)	α CTD	[30, 67, 84, 98]
CysB	p_{cysA}	α CTD	[23, 89]
	p_{adi}	α CTD	[81]
FIS	$rrnB$ P1	α NTD (?)	[10]
FliH/D/FliC	p_{fliA} , p_{fliB} , p_{fliL}	α CTD	[55]
GalR	lac P2	α CTD	[17]
IHF	P_e (fag Mu)	α CTD	[94]
	p_L (fag λ)	α CTD	[24, 25, 26]
LacI	lac P2	α CTD	[17]
MalT	p_{malP}	α CTD (?)	[19]
MelR	p_{melAB}	α CTD	[23, 89]
MerR	$p_{merTPCAD}$	α CTD i σ^{70}	[15]
MetR	p_{metE}	α CTD (?)	[37, 38]
Mor (fag Mu)	P_m (fag Mu)	α CTD i σ^{70}	[2]
Ogr (fag P2)	p_F (fag P2)	α CTD	[6]
OmpR	p_{ompF} , p_{ompC}	α CTD	[41, 71, 82, 93]
OxrA (FNR) (<i>S. typhimurium</i>)	p_{pepT} (<i>Salmonella typhimurium</i>)	α CTD (<i>Salmonella typhimurium</i>)	[56]
OxyR	p_{katG} , p_{ahpC} , p_{oxyX}	α CTD	[87]
p4 (fag ϕ 29)	p_{A3} (fag ϕ 29)	α CTD (<i>B. subtilis</i>)	[57]
TrpI	trp P _B (<i>Ps. aeruginosa</i>)	α CTD	[30]
TyrR	tyr P	α CTD	[49]
δ (fag P4)	p_F (fag P2)	α CTD	[6]

się z rejonem zachodzącym na sekwencję "-35", nie wymagają C-końcowej domeny podjednostki α [35, 36]. Okazało się jednak, że przynajmniej niektóre białka aktywatorowe, których miejsce wiązania się z DNA zachodzi na rejon "-35", mogą stymulować inicjację transkrypcji przez bezpośrednie oddziaływanie z α CTD [30, 67, 84, 98].

Pomimo poznania specyficznych rejonów polimerazy RNA kontaktujących się bezpośrednio z ponad dwudziestoma aktywatorami transkrypcji (tab. 1), miejsca kontaktu na powierzchni polimerazy RNA z wieloma pozytywnymi regulatorami inicjacji transkrypcji nie zostały dotąd określone. Przykładem może być chociażby białko DnaA, inicjator replikacji DNA będący jednocześnie czynnikiem transkrypcyjnym [58]. Wykazano, że DnaA aktywuje transkrypcję operonu *nrd* [5], genu *fliC* [59], genu *glpD* [58], genu *polA* [72] oraz stymuluje inicjację transkrypcji z promotora p_R bakteriofaga λ [99]. Umieszczenie potencjalnych rejonów wiązania się białka DnaA w okolicach aktywowanych promotorów pozwala sądzić, że DnaA może oddziaływać bezpośrednio z polimerazą RNA. Dotychczas nie wiadomo jednak, z którą podjednostką polimerazy RNA kontaktuje się DnaA. Lokalizacja miejsc wiązania się DnaA w rejonie promotorów operonu *nrd* i genów *fliC*, *glpD* oraz *polA* skłania do przypuszczeń, że DnaA kontaktuje się z podjednostką α bądź σ^{70} [58]. Natomiast położenie potencjalnych miejsc wiązania się DnaA jedynie za promotorem p_R [88] mogłoby sugerować oddziaływania raczej z podjednostką β . Warto nadmienić, że już od dawna znane jest zjawisko allelo-specyficznej supresji niektórych mutacji w genie *dnaA* przez mutacje w genie *rpoB*, kodującym podjednostkę β polimerazy RNA [3, 7]. Co prawda do tej pory nie są znane aktywatory transkrypcji mogące oddziaływać z podjednostką β , jednakże proponuje się, że zasadniczo jakakolwiek eksponowana na zewnątrz część holoenzymu polimerazy RNA może potencjalnie służyć jako miejsce kontaktu z białkami regulatorowymi [64].

4. AKTYWACJA TRANSKRYPCJI PRZEZ ODDZIAŁYWANIE PODJEDNOSTKI α POLIMERAZY RNA Z ELEMENTEM UP

Badania nad aktywnością promotora *rrn* P1 (z którego rozpoczyna się transkrypcja genów kodujących rybosomalne RNA), doprowadziły do wykrycia trzeciego (oprócz

Notka do tabeli 1. Większość zamieszczonych danych dotyczy białek i promotorów *Escherichia coli*; w przypadku pochodzenia białek lub promotorów z innych gatunków bakterii lub z fagów, informacje te są podane w nawiasach w odpowiednich rubrykach. Przedstawione są jedynie te aktywatory, co do których istnieją dane genetyczne lub biochemiczne dokumentujące lub sugerujące bezpośrednie oddziaływanie z konkretną podjednostką polimerazy RNA. (?) oznacza, że istnieją przeciwstawne dane odnośnie bezpośredniego kontaktu pomiędzy poszczególnymi białkami albo że przypuszczenia o oddziaływaniu oparte są na pośrednich obserwacjach.

sekwencji "-10" i "-35") rejonu DNA przed miejscem startu transkrypcji, z którym bezpośrednio oddziałuje polimeraza RNA [63, 73, 75]. Rejon ten nazwano elementem UP. Obejmuje on sekwencję kilkunastu par AT zlokalizowanych przed rejonem "-35", z którą specyficznie oddziałuje C-terminalna domena podjednostki α polimerazy RNA zwiększając kilkudziesięciokrotnie siłę promotora [9, 22, 60, 63, 73, 75]. W promotorze *rnn P1* odcinek bogaty w pary AT obejmuje pozycje od -40 do -60, ale do aktywacji wystarczający jest rejon od -47 do -57 [63]. Element UP nie jest charakterystyczny jedynie dla promotora *rnn P1*. Podobne sekwencje (bogate w pary AT), które wyraźnie zwiększają częstość inicjacji transkrypcji, wykryto w rejonach od -40 do -60 w kilku innych promotorach, takich jak: promotor operonu *ace* [61], promotory genów *ada* i *aidB* [48] czy promotor p_L bakteriofaga λ [27]. We wszystkich tych przypadkach do aktywacji promotora niezbędne jest oddziaływanie α CTD z sekwencją elementu UP. Za wiązanie się α CTD do DNA w rejonie elementu UP odpowiedzialne są te same fragmenty łańcucha polipeptydowego, które kontaktują się z białkowymi aktywatorami transkrypcji, czyli helisy H1 i H4 [39]. Okazuje się również, że przynajmniej w przypadku pewnych promotorów (takich jak np. promotor p_M bakteriofaga λ) podjednostka α polimerazy RNA może oddziaływać niespecyficznie (tzn. niezależnie od sekwencji DNA) z rejonem DNA położonym przed promotorem, aktywując transkrypcję kilkukrotnie [86].

5. AKTYWACJA TRANSKRYPCJI PRZEZ PROKARIOTYCZNE "WZMACNIACZE"

Dwa wyżej opisane systemy aktywacji transkrypcji w komórkach prokariotycznych dotyczyły oddziaływania polimerazy RNA z sekwencjami DNA lub białkowymi aktywatorami zlokalizowanymi w bezpośrednim sąsiedztwie promotorów. Trzeci system obejmuje mechanizmy, w których białkowy aktywator łączy się w miejscu na tyle odległym od promotora, że wyklucza to tego typu oddziaływania, jak to opisano w rozdziale 3. Zatem ten mechanizm przypominać może funkcjonowanie "wzmacniaczy" w komórkach eukariotycznych, stąd nazwa prokariotyczne "wzmacniacze".

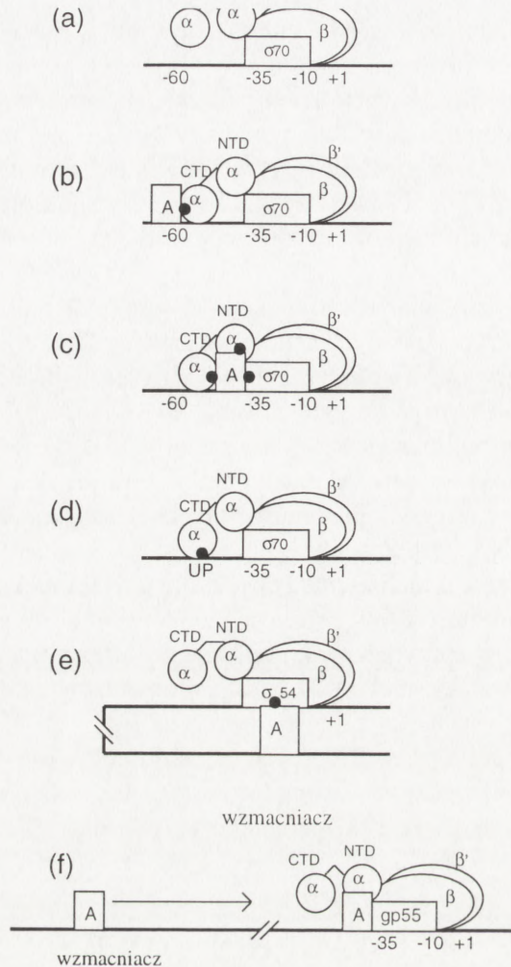
Istnieją dwa różne rodzaje aktywacji transkrypcji przez prokariotyczne "wzmacniacze", ale w obu przypadkach polimeraza RNA może efektywnie łączyć się z sekwencją promotora nie mogąc jednak rozpocząć transkrypcji [29]. Przykładem funkcjonowania pierwszego rodzaju "wzmacniaczy" jest regulacja transkrypcji genów związanych z metabolizmem azotowym przez aktywator NtrC. Promotory tych genów są rozpoznawane przez holoenzym polimerazy RNA zawierający czynnik σ^{54} . Bez działania aktywatora, polimeraza RNA wiąże się w rejonie promotora, lecz pozostaje nieaktywna transkrypcyjnie [33, 95]. W obrębie sekwencji "wzmac-

niacza" tworzy się oligomeryczny kompleks aktywatora, mający m.in. aktywność ATPazy, potrzebnej do przekształcenia polimerazy RNA związanej z promotorem w formę aktywną, zdolną do wytworzenia kompleksu otwartego [66, 70, 96, 97]. Wymaga to bezpośredniego kontaktu pomiędzy NtrC a polimerazą RNA, który staje się możliwy dzięki utworzeniu pętli DNA pomiędzy miejscami wiązania się obu białek [83]. Zarówno doświadczenia genetyczne, jak i dane biochemiczne wskazują, że aktywator oddziałuje bezpośrednio z podjednostką σ^{54} polimerazy RNA [50, 51, 95].

Drugi mechanizm działania "wzmacniaczy" w komórkach prokariotycznych dotyczy aktywacji transkrypcji późnych genów bakteriofaga T4. Promotory tych genów są rozpoznawane przez rdzeń polimerazy RNA *E. coli* związany ze specyficznym czynnikiem σ kodowanym przez gen 55 faga T4 [11]. Pomimo związania się z sekwencją promotora polimeraza RNA nie może jednak rozpocząć transkrypcji i wymaga specyficznej aktywacji. Aktywatorem w tym przypadku jest produkt fagowego genu 45, który jest analogiem eukariotycznego białka PCNA i bierze także udział w replikacji DNA [90]. Produkt genu 45 zostaje związany do DNA w rejonie "wzmacniacza", znacznie oddalonym od promotora [79]. Ponieważ aktywacja transkrypcji z późnych promotorów faga wymaga oddziaływania aktywatora z polimerazą RNA i przez to umożliwia utworzenie kompleksu otwartego, białko kodowane przez gen 45 posuwa się wzdłuż nici DNA aż do momentu bezpośredniego kontaktu z polimerazą RNA związaną w rejonie promotora [31, 78]. Nie wiadomo dotąd, z którą podjednostką polimerazy RNA oddziałuje produkt genu 45 faga T4 podczas aktywacji transkrypcji z późnych promotorów fagowych. Doświadczenia *in vitro* wskazują jedynie, że aktywacja ta zachodzi efektywnie przy braku C-terminalnej domeny podjednostki α [91].

6. UWAGI KOŃCOWE

Doświadczenia ostatnich kilku lat pozwoliły poznać podstawy mechanizmów aktywacji transkrypcji w komórkach prokariotycznych, przynajmniej w przypadku kilku modelowych systemów. Obok bezpośredniego kontaktu polimerazy RNA z białkiem aktywatorowym związanym z rejonem DNA blisko sąsiadującym z promotorem, w aktywacji transkrypcji istotną rolę mogą odgrywać oddziaływania polimerazy RNA z sekwencją DNA zwaną elementem UP oraz funkcjonowanie prokariotycznych "wzmacniaczy". Wszystkie te mechanizmy zostały przedstawione schematycznie na rysunku 1. Warto zwrócić uwagę na bardzo istotną rolę, jaką odgrywa podjednostka α polimerazy RNA w co najmniej dwóch z trzech znanych rodzajów aktywacji transkrypcji w komórkach bakteryjnych. Podjednostka ta była jeszcze do niedawna uważana jedynie za element polimerazy RNA potrzebny do złożenia kompleksu holoenzymu. Wykrycie kilku pierwszych przypadków udziału podjednostki α w aktywacji niektórych promotorów rozbudziło znacznie zain-



Rys. 1. Mechanizmy aktywacji transkrypcji w komórkach prokariotycznych. (a) Promotory które nie podlegają pozytywnej regulacji wymagają jedynie rejonów promotorowych "-10" i "-35"; podjednostka α polimerazy RNA nie kontaktuje się z DNA. (b) Pozytywna regulacja przez aktywatory (oznaczone jako A) wiążące się z DNA w okolicach -60 wymaga oddziaływania białka aktywatorowego z C-terminalną domeną (CTD) podjednostki α polimerazy RNA (miejsce kontaktu aktywatora z polimerazą RNA zaznaczone jest małym zaczerntonym kółkiem). (c) Aktywatory wiążące się z DNA w rejonie pokrywającym się częściowo z sekwencją "-35" oddziałują z C-terminalną (CTD) i N-terminalną (NTD) domeną podjednostki α bądź też z podjednostką σ^{70} ; możliwe jest oddziaływanie aktywatora tylko z jednym z tych miejsc, z dwoma lub nawet równoczesne oddziaływanie z wszystkimi trzema. (d) Niektóre promotory zawierają sekwencję DNA zwaną elementem UP, z którą kontaktuje się C-terminalna domena podjednostki α , co prowadzi do aktywacji transkrypcji. (e) Jednym ze sposobów aktywacji transkrypcji poprzez działanie prokariotycznych "wzmacniaczy" jest wytworzenie pętli DNA i bezpośrednie oddziaływanie białka aktywatorowego (związanego z sekwencją "wzmacniacza") z podjednostką σ^{54} polimerazy RNA. (f) Inny mechanizm działania prokariotycznych "wzmacniaczy" polega na związaniu się białka aktywatorowego z sekwencją DNA znacznie oddaloną od promotora, a następnie przemieszczanie się tego białka wzdłuż DNA (strzałka) aż do momentu bezpośredniego kontaktu z polimerazą RNA związaną z promotorem. Schematy nie są wykonane w skali

teresowanie tym białkiem i skłoniło w 1992 roku Russo i Silhavy'ego do nazwania podjednostki α "kopciuszkiem" wśród innych podjednostek polimerazy RNA [76]. Jak na "kopciuszka" przystało, podjednostka α okazała się godną zainteresowania. Ostatnie doniesienia wskazują, że jest ona nie tylko miejscem kontaktu wielu aktywatorów transkrypcji i sama zwiększa aktywność niektórych promotorów przez oddziaływanie z elementem UP, ale także odgrywa bardzo ważną rolę podczas elongacji, terminacji i antyterminacji transkrypcji [21, 53, 54, 68, 80].

LITERATURA

- [1] ADHYA S, GARGES S. Positive control. *J Biol Chem* 1990; **265**: 10797–10800.
- [2] ARTSIMOVITCH I, MURAKAMI K, ISHIHAMA A, HOWE MM. Transcription activation by the bacteriophage Mu Mor protein requires the C-terminal regions of both α and σ^{70} subunits of *Escherichia coli* RNA polymerase. *J Biol Chem* 1996; **271**: 32343–32348.
- [3] ATLUNG T. Allele-specific suppression of *dnaA*(Ts) mutations in *Escherichia coli*. *Mol Gen Genet* 1984; **197**: 125–128.
- [4] ATTEY A, BELYAEVA T, SAVERY N, HOGGETT J, FUJITA N, ISHIHAMA A, BUSBY S. Interactions between the cyclic AMP receptor protein and the alpha subunit of RNA polymerase at the *Escherichia coli* galactose operon *P*₁ promoter. *Nucleic Acids Res* 1994; **22**: 4375–4380.
- [5] AUGUSTIN LB, JACOBSON BA, FUCHS JA. *Escherichia coli* FIS and DnaA proteins bind specifically to the *nrd* promoter region and affect expression of an *nrd-lac* fusion. *J Bacteriol* 1994; **176**: 378–387.
- [6] AYERS DJ, SUNSHINE MG, SIX EW, CHISTIE GE. Mutations affecting two adjacent amino acid residues in the alpha subunit of RNA polymerase block transcriptional activation by the bacteriophage P2 Ogr protein. *J Bacteriol* 1994; **176**: 7430–7438.
- [7] BAGDASARIAN MM, IZAKOWSKA M, BAGDASARIAN M. Suppression of the *dnaA* phenotype by mutations in the *rpoB* cistron of RNA polymerase in *S. typhimurium* and *E. coli*. *J Bacteriol* 1977; **130**: 577–582.
- [8] BELYAEVA TA, BOWN JA, FUJITA N, ISHIHAMA A, BUSBY SJW. Location of the C-terminal domain of the RNA polymerase α subunit in different open complexes at the *Escherichia coli* galactose operon regulatory region. *Nucleic Acids Res* 1996; **24**: 2243–2251.
- [9] BLATTER EE, ROSS W, TANG H, GOURSE RL, EBRIGHT RH. Domain organization of RNA polymerase α subunit: C-terminal 85 amino acids constitute a domain capable of dimerization and DNA binding. *Cell* 1994; **78**: 889–896.
- [10] BOKAL IV AJ, ROSS W, GOURSE RL. The transcriptional activator protein FIS: DNA interactions and cooperative interactions with RNA polymerase at the *Escherichia coli* *rnnB* P₁ promoter. *J Mol Biol* 1995; **245**: 197–207.
- [11] BRODY EN, KASSAVETIS GA, OUHAMMOUCH M, SANDERS GM, TINKER RL, GEIDUSCHEK EP. Old phage, new insights: two recently recognized mechanisms of transcriptional regulation in bacteriophage T4 development. *FEMS Microbiol Lett* 1995; **128**: 1–8.
- [12] BUSBY S, EBRIGHT RH. Promoter structure, promoter recognition, and transcription activation in prokaryotes. *Cell* 1994; **79**: 743–746.
- [13] BUSBY S, EBRIGHT RH. Transcription activation at class II CAP-dependent promoters. *Mol Microbiol* 1997; **23**: 853–859.
- [14] BUSBY S, WEST D, LAWES M, WEBSTER C. Transcription activation by the *Escherichia coli* cyclic AMP receptor protein: receptors bound in tandem at promoters can interact synergistically. *J Mol Biol* 1994; **241**: 341–352.

- [15] CASLAKE LF, ASHRAF SI, SUMMERS AO. Mutations in the alpha and sigma-70 subunits of RNA polymerase affect expression of the *mer* operon. *J Bacteriol* 1997; **179**: 1787–1795.
- [16] CHEN Y, EBRIGHT Y, EBRIGHT R. Identification of the target of a transcription activator protein by protein-protein photocrosslinking. *Science* 1994; **265**: 90–92.
- [17] CHOY H, PARK SW, AKI T, PARRACK P, FUJITA N, ISHIHAMA A, ADHYA S. Repression and activation of transcription by Gal and Lac repressors: involvement of alpha subunit of RNA polymerase. *EMBO J* 1995; **14**: 4523–4529.
- [18] CZARNIECKI D, NOEL RJ, REZNIKOFF WS. The -45 region of the *Escherichia coli lac* promoter: CAP-dependent and CAP-independent transcription. *J Bacteriol* 1997; **179**: 423–429.
- [19] DANOTO, RAIBAUD O. Multiple protein-DNA and protein-protein interactions are involved in transcriptional activation by MalT. *Mol Microbiol* 1994; **14**: 335–346.
- [20] EBRIGHT RH, BUSBY S. The *Escherichia coli* RNA polymerase α subunit: structure and function. *Curr Opin Genet Dev* 1995; **5**: 197–203.
- [21] FRIEDMAN DI, COURT DL. Transcription antitermination: the λ paradigm updated. *Mol Microbiol* 1995; **18**: 191–200.
- [22] GAAL T, ROSS W, BLATTER EE, TANG H, JIA X, KRISHNAN VV, ASSA-MUNT N, EBRIGHT RH, GOURSE RL. DNA-binding determinants of the α subunit of RNA polymerase: novel DNA-binding domain architecture. *Genes Dev* 1996; **10**: 16–26.
- [23] GIFFARD PM, BOOTH IR. The *rpoA341* allele of *Escherichia coli* specifically impairs the transcription of a group of positively regulated operons. *Mol Gen Genet* 1988; **214**: 148–152.
- [24] GILADI H, GOTTESMAN M, OPPENHEIM AB. Integration host factor stimulates the phage lambda pL promoter. *J Mol Biol* 1990; **213**: 109–121.
- [25] GILADI H, IGARASHI K, ISHIHAMA A, OPPENHEIM AB. Stimulation of the phage λ pL promoter by integration host factor requires the carboxy terminus of the α -subunit of RNA polymerase. *J Mol Biol* 1992; **227**: 985–990.
- [26] GILADI H, KOBY S, GOTTESMAN ME, OPPENHEIM AB. Supercoiling, integration host factor, and a dual promoter system, participate in the control of the bacteriophage λ pL promoter. *J Mol Biol* 1992; **224**: 937–948.
- [27] GILADI H, MURAKAMI K, ISHIHAMA A, OPPENHEIM AB. Identification of an UP element within the IHF binding site at the P_{L1}-P_{L2} tandem promoter of bacteriophage λ . *J Mol Biol* 1996; **260**: 484–491.
- [28] GOODRICH J, CUTLER G, TJIAN R. Contacts in context: promoter specificity and macromolecular interactions in transcription. *Cell* 1996; **84**: 825–830.
- [29] GRALLA JD. Activation and repression of *E. coli* promoters. *Curr Opin Genet Dev* 1996; **6**: 526–530.
- [30] GUSSIN GN, OLSON C, IGARASHI K, ISHIHAMA A. Activation defects caused by mutations in *Escherichia coli rpoA* are promoter specific. *J Bacteriol* 1992; **174**: 5156–5160.
- [31] HERENDEEN DR, KASSAVETIS GA, GEIDUSCHEK EP. A transcriptional enhancer whose function imposes requirement that proteins track along DNA. *Science* 1992; **256**: 1298–1303.
- [32] HEYDUK T, HEYDUK E, SEVERINOV K, TANG H, EBRIGHT RH. Determinants of RNA polymerase α subunit for interaction with β , β' , and σ subunits: hydroxyl-radical protein footprinting. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; **93**: 10162–10166.
- [33] HSIEH M, TINTUT Y, GRALLA JD. Functional role for the glutamines within the glutamine-rich region of the transcription factor sigma 54. *J Biol Chem* 1994; **269**: 373–378.
- [34] IGARASHI K, FUJITA N, ISHIHAMA A. Identification of a subunit assembly domain in the alpha subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase. *J Mol Biol* 1991; **218**: 1–6.
- [35] ISHIHAMA A. Role of the RNA polymerase alpha subunit in transcription activation. *Mol Microbiol* 1992; **6**: 3283–3288.
- [36] ISHIHAMA A. Protein-protein communication within the transcription apparatus. *J Bacteriol* 1993; **175**: 2483–2489.

- [37] JAFRI S, URBANOWSKI ML, STAUFFER GV. A mutation in the *rpoA* gene encoding the subunit of RNA polymerase that affects *metE-metR* transcription in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 1995; **177**: 524–529.
- [38] JAFRI S, URBANOWSKI ML, STAUFFER GV. The glutamic acid residue at amino acid 261 of the α subunit is a determinant of the intrinsic efficiency of RNA polymerase at the *metE* core promoter in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 1996; **178**: 6810–6816.
- [39] JEON YH, NEGISHI T, SHIRAKAWA M, YAMAZAKI T, FUJITA N, ISHIHAMA A, KYOGOKU Y. Solution structure of the activator contact domain of the RNA polymerase α subunit. *Science* 1995; **270**: 1495–1497.
- [40] JIN R, SHARIF KA, KRAKOW JS. Evidence for contacts between the cyclic AMP receptor protein and the σ^{70} subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase. *J Biol Chem* 1995; **270**: 19213–19216.
- [41] KATO N, AIBA H, MIZUNO T. Suppressor mutations in α -subunit of RNA polymerase for a mutant of the positive regulator, OmpR, in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett* 1996; **139**: 175–180.
- [42] KIMURA M, FUJITA N, ISHIHAMA A. Functional map of the alpha subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase: deletion analysis of the amino-terminal assembly domain. *J Mol Biol* 1994; **242**: 107–115.
- [43] KIMURA M, ISHIHAMA A. Functional map of the alpha subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase: insertion analysis of the amino-terminal assembly domain. *J Mol Biol* 1995; **248**: 756–767.
- [44] KIMURA M, ISHIHAMA A. Functional map of the alpha subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase: amino acid substitution within the amino-terminal assembly domain. *J Mol Biol* 1995; **254**: 342–349.
- [45] KOLKHOF P, MULLER-HILL B. Lambda *cI* repressor mutants altered in transcriptional activation. *J Mol Biol* 1994; **242**: 23–36.
- [46] KULDELL N, HOCHSCHILD A. Amino acid substitutions in the -35 recognition motif of σ^{70} that result in defects in phage λ repressor-stimulated transcription. *J Bacteriol* 1994; **176**: 2991–2998.
- [47] KUMAR A, GRIMES B, FUJITA N, MAKINO K, MALLOCH RA, HAYWARD RS, ISHIHAMA A. Role of the sigma⁷⁰ subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase in transcription activation. *J Mol Biol* 1994; **235**: 405–413.
- [48] LANDINI P, VOLKERT MR. RNA polymerase α subunit binding site in positively controlled promoters: a new model of RNA polymerase-promoter interaction and transcriptional activation in the *Escherichia coli* *ada* and *aidB* genes. *EMBO J* 1995; **14**: 4329–4335.
- [49] LAWLEY B, FUJITA N, ISHIHAMA A, PITTARD AJ. The TyrR protein of *Escherichia coli* is a class I transcription activator. *J Bacteriol* 1995; **177**: 238–241.
- [50] LEE HS, ISHIHAMA A, KUSTU S. The C terminus of the α subunit of RNA polymerase is not essential for transcriptional activation of σ^{54} holoenzyme. *J Bacteriol* 1993; **175**: 2479–2482.
- [51] LEE JH, HOOVER TR. Protein crosslinking studies suggest that *Rhizobium meliloti* C4-dicarboxylic acid transport protein D, a sigma 54-dependent transcriptional activator, interacts with sigma 54 and the beta subunit of RNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; **92**: 9702–9706.
- [52] LI M, MOYLE H, SUSSKIND MM. Target of the transcriptional activation function of phage λ cI protein. *Science* 1994; **263**: 75–77.
- [53] LIU K, HANNA MM. NusA interferes with interactions between the nascent RNA and the C-terminal domain of the β subunit of RNA polymerase in *Escherichia coli* transcription complexes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; **92**: 5012–5016.

- [54] LIU K, ZHANG Y, SEVERINOV K, DAS A, HANNA MM. Role of *Escherichia coli* RNA polymerase alpha subunit in modulation of pausing, termination and anti-termination by the transcription elongation factor NusA. *EMBO J* 1996; **15**: 150–161.
- [55] LIU X, FUJITA N, ISHIHAMA A, MATSUMURA P. The C-terminal region of the α subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase is required for transcriptional activation of the flagellar level II operons by the FlhD/FlhC complex. *J Bacteriol* 1995; **177**: 5186–5188.
- [56] LOMBARDO M-J, BAGGA D, MILLER CG. Mutations in *rpoA* affect expression of anaerobically regulated genes in *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* 1991; **173**: 7511–7518.
- [57] MENCIA M, MONSALVE M, ROJO F, SALAS M. Transcription activation by phage ϕ 29 protein p4 is mediated by interaction with the α subunit of *Bacillus subtilis* RNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; **93**: 6616–6620.
- [58] MESSER W, WEIGEL C. DnaA initiator – also a transcription factor. *Mol Microbiol* 1997; **24**: 1–6.
- [59] MIZUSHIMA T, TOMURA A, SHINPUKU T, MIKI T, SEKIMIZU K. Loss of flagellation in *dnaA* mutants of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 1994; **176**: 5544–5546.
- [60] MURAKAMI K, FUJITA N, ISHIHAMA A. Transcription factor recognition surface on the RNA polymerase α subunit is involved in contact with the DNA enhancer element. *EMBO J* 1996; **15**: 4358–4367.
- [61] NEGRE D, BONOD-BIDAUD C, OUDOT C, PROST J-F, KOLB A, ISHIHAMA A, COZZONE A, CORTAY J-C. DNA flexibility of the UP element is a major determinant of transcriptional activation at the *Escherichia coli* acetate promoter. *Nucleic Acids Res* 1997; **25**: 713–718.
- [62] NEIGISHI T, FUJITA N, ISHIHAMA A. Structural map of the alpha subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase: structural domains identified by proteolytic cleavage. *J Mol Biol* 1995; **248**: 723–728.
- [63] NEWLANDS J, JOSAITIS C, ROSS W, GOURSE R. Both FIS-dependent and factor-independent upstream activation of the *rnnB* P1 promoter are face of the halix dependent. *Nucleic Acids Res* 1992; **20**: 719–726.
- [64] NIU W, KIM Y, TAU G, HEYDUK T, EBRIGHT RH. Transcription activation at class II CAP-dependent promoters: two interactions between CAP and RNA polymerase. *Cell* 1996; **87**: 1123–1134.
- [65] NIU W, ZHOU Y, DONG Q, EBRIGHT YW, EBRIGHT RH. Characterization of the activation region of *Escherichia coli* catabolite gene activator protein (CAP). I. Saturation and alanine-scanning mutagenesis. *J Mol Biol* 1994; **243**: 595–602.
- [66] NORTH AK, KLOSE KE, STEDMAN KM, KUSTU S. Prokaryotic enhancer-binding proteins reflect eukaryote-like modularity: the puzzle of nitrogen regulatory protein C. *J Bacteriol* 1993; **175**: 4267–4273.
- [67] OBUCHOWSKI M, GILADI H, KOPY S, SZALEWSKA-PALASZ A, WĘGRZYN A, OPPENHEIM AB, THOMAS MS, WĘGRZYN G. Impaired lysogenisation of the *Escherichia coli* *rpoA341* mutant by bacteriophage λ is due to the inability of CII to act as a transcriptional activator. *Mol Gen Genet* 1997; **254**: 304–311.
- [68] OBUCHOWSKIM, WĘGRZYN A, SZALEWSKA-PALASZ A, THOMAS MS, WĘGRZYN G. An RNA polymerase α subunit mutant impairs N-dependent transcriptional antitermination in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 1997; **23**: 211–222.
- [69] POLYAKOV A, SEVERINOVA E, DARST SA. Three-dimensional structure of *E. coli* core RNA polymerase: promoter binding and elongation conformations of the enzyme. *Cell* 1995; **83**: 365–373.
- [70] PORTER SC, NORTH AK, WEDEL AB, KUSTU S. Oligomerization of NTRC at the *glnA* enhancer is required for transcriptional activation. *Genes Dev* 1993; **7**: 2258–2273.
- [71] PRATT LA, SILHAVY TJ. OmpR mutants specifically defective for transcriptional activation. *J Mol Biol* 1994; **243**: 579–594.

- [72] QUINONES A, WANDT G, KLEINSTAUBER S, MESSER W. DnaA protein stimulates *polA* gene expression in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 1997; **23**: 1193–1202.
- [73] RAO L, ROSS W, APPLEMAN JA, GAAL T, LEIRMO S, SCHLAX P, RECORD MT, GOURSE R. Factor independent activation of *rrnB*P1: an 'extended' promoter with an upstream element that dramatically increases promoter strength. *J Mol Biol* 1994; **235**: 1421–1435.
- [74] RHODIUS VA, WEST DM, WEBSTER CL, BUSBY SJW, SAVERY NJ. Transcriptional activation at class II CRP-dependent promoters: the role of different activating regions. *Nucleic Acids Res* 1997; **25**: 326–332.
- [75] ROSS W, GOSINK K, SALOMON J, IGARASHI K, ZOU C, ISHIHAMA A, SEVERINOV K, GOURSE R. A third recognition element in bacterial promoters: DNA binding by the alpha subunit of RNA polymerase. *Science* 1993; **262**: 1407–1413.
- [76] RUSSO FD, SILHAVY TJ. Alpha: the Cinderella subunit of RNA polymerase. *J Biol Chem* 1992; **267**: 14515–14518.
- [77] SAKUMI K, IGARASHI K, SEKIGUCHI M, ISHIHAMA A. The Ada protein is a class I transcription factor of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 1993; **175**: 2455–2457.
- [78] SANDERS GM, KASSAVETIS GA, GEIDUSCHEK EP. Use of a macromolecular crowding agent to dissect interactions and define functions in transcriptional activation by a DNA-tracking protein: bacteriophage T4 gene 45 protein and late transcription. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; **91**: 7703–7707.
- [79] SANDERS GM, KASSAVETIS GA, GEIDUSCHEK EP. Rules governing the efficiency and polarity of loading a tracking clamp protein onto DNA: determinants of enhancement in bacteriophage T4 late transcription. *EMBO J* 1995; **14**: 3966–3976.
- [80] SCHAUER AT, CHENG S-WC, ZHENG C, StPIERRE L, ALESSI D, HIDAYETOGLU DL, COSTANTINO N, COURT DL, FRIEDMAN DI. The alpha subunit of RNA polymerase and transcription antitermination. *Mol Microbiol* 1996; **21**: 839–851.
- [81] SHI X, BENNETT GN. Effects of *rpoA* and *cysB* mutations on acid induction of biodegradative arginine decarboxylase in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 1994; **176**: 7017–7023.
- [82] SLAUCH JM, RUSSO FD, SILHAVY TJ. Suppressor mutations in *rpoA* suggest that OmpR controls transcription by direct interaction with the α subunit of RNA polymerase. *J Bacteriol* 1991; **173**: 7501–7510.
- [83] SU W, PORTER S, KUSTU S, ECHOLS H. DNA-looping and enhancer activity: association between DNA-bound NTRC activator and RNA polymerase at the bacterial *glnA* promoter. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; **87**: 5504–5508.
- [84] SZALEWSKA-PAŁASZ A, WĘGRZYN A, OBUCHOWSKI M, PAWŁOWSKI R, BIELAWSKI K, THOMAS MS, WĘGRZYN G. Drastically decreased transcription from CII-activated promoters is responsible for impaired lysogenization of the *Escherichia coli rpoA341* mutant by bacteriophage λ . *FEMS Microbiol Lett* 1996; **144**: 21–27.
- [85] TANG H, SEVERINOV K, GOLDFARB A, FENYO D, CHAIT B, EBRIGHT RH. Location, structure, and function of the target of a transcriptional activator protein. *Genes Dev* 1994; **8**: 3058–3067.
- [86] TANG Y, MURAKAMI K, ISHIHAMA A, De HASETH PL. Upstream interactions at the lambda *p_{RM}* promoter are sequence nonspecific and activate the promoter to a lesser extent than an introduced UP element of an rRNA promoter. *J Bacteriol* 1996; **178**: 6945–6951.
- [87] TAO K, ZOU C, FUJITA N, ISHIHAMA A. Mapping of the OxyR protein contact site in the C-terminal region of RNA polymerase α subunit. *J Bacteriol* 1995; **177**: 6740–6744.
- [88] TAYLOR K, WĘGRZYN G, WĘGRZYN A, SZALEWSKA-PAŁASZ A, HERMAN A, OBUCHOWSKI M, ŚRUTKOWSKA S, KONOPA G. *Escherichia coli* initiator protein DnaA, cell cycle, and control of λ plasmid replication. *Bull Polish Acad Sci Biol Sci* 1996; **44**: w druku.
- [89] THOMAS MS, GLASS RE. *Escherichia coli rpoA* mutation which impairs transcription of positively regulated systems. *Mol Microbiol* 1991; **5**: 2719–2725.

- [90] TINKER RL, KASSAVETIS GA, GEIDUSCHEK EP. Detecting the ability of viral, bacterial and eukaryotic replication proteins to track along DNA. *EMBO J* 1994; **13**: 5330–5337.
- [91] TINKER RL, SANDERS GM, SEVERINOV K, KASSAVETIS GA, GEIDUSCHEK EP. The COOH-terminal domain of the RNA polymerase α subunit in transcriptional enhancement and the activation at the bacteriophage T4 late promoter. *J Biol Chem* 1995; **270**: 15899–15907.
- [92] TJIAN R, MANIATIS T. Transcriptional activation: a complex puzzle with few easy pieces. *Cell* 1994; **77**: 5–8.
- [93] TSUZUKI M, AIBA H, MIZUNO T. Gene activation by the *Escherichia coli* positive regulator, *OmpR*: phosphorylation-independent mechanism of activation by an *OmpR* mutant. *J Mol Biol* 1994; **242**: 607–613.
- [94] Van ULSEN P, HILLEBRAND M, KAINZ M, COLLARD R, ZULIANELLO L, Van de PUTTE P, GOURSE RL, GOOSEN N. Function of the C-terminal domain of the alpha subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase in basal expression and integration host factor-mediated activation of the early promoter of bacteriophage Mu. *J Bacteriol* 1997; **179**: 530–537.
- [95] WANG JT, SYED A, HSIEH M-L, GRALLA JD. Converting *Escherichia coli* RNA polymerase into an enhancer-responsive enzyme – role of an NH₂-terminal leucine path in sigma 54. *Science* 1995; **270**: 992–994.
- [96] WEDEL A, KUSTU S. The bacterial enhancer-binding protein NTRC is a molecular machine: ATP hydrolysis is coupled to transcriptional activation. *Genes Dev* 1995; **9**: 2042–2052.
- [97] WEISS V, CLAVERINE MF, MAGASANIK B. Phosphorylation of nitrogen regulator I of *Escherichia coli* induces strong cooperative binding to the DNA essential for activation of transcription. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; **89**: 5088–5092.
- [98] WĘGRZYN G, GLASS RE, THOMAS MS. Involvement of the *Escherichia coli* RNA polymerase α subunit in transcriptional activation by the bacteriophage lambda CI and CII proteins. *Gene* 1992; **122**: 1–7.
- [99] WĘGRZYN G, SZALEWSKA-PAŁASZ A, WĘGRZYN A, OBUCHOWSKI M, TAYLOR K. Transcriptional activation of the origin of coliphage λ DNA replication is regulated by the host DnaA initiator function. *Gene* 1995; **154**: 47–50.
- [100] WHIPPLE FW, PTASHNE M, HOCHSCHILD A. The activation defect of a λ *ci* positive control mutant. *J Mol Biol* 1997; **265**: 261–265.
- [101] WILLIAMS RM, RHODIUS VA, BELL AI, KOLB A, BUSBY SJW. Orientation of functional activating regions in *Escherichia coli* CRP protein during transcription activation at class II promoters. *Nucleic Acids Res* 1996; **24**: 1112–1118.
- [102] ZHOU Y, MERKEL TJ, EBRIGHT RH. Characterization of the activating region of *Escherichia coli* catabolite gene activator protein (CAP). II. Role at class I and class II CAP-dependent promoters. *J Mol Biol* 1994; **243**: 603–610.
- [103] ZHOU Y, PENDERGRAST PS, BELL A, WILLIAMS R, BUSBY S, EBRIGHT RH. The functional subunit of a dimeric transcription activator protein depends on promoter architecture. *EMBO J* 1994; **13**: 4549–4557.
- [104] ZOU C, FUJITA N, ISHIHAMA A. Asymmetric arrangement of two alpha subunits within *Escherichia coli* RNA polymerase: involvement of one alpha subunit in contact with cAMP receptor protein. *J Mol Biol* 1994; **236**: 1283–1288.

Otrzymano:–

Przyjęto: 24.06. 1997 r.

ul. Kładki 24, 80-822 Gdańsk

LUZKI GENOM MITOCHONDRIALNY – MUTACJE, POLIMORFIZMY I CHOROBY*

THE HUMAN MITOCHONDRIAL GENOME – MUTATIONS, POLYMORPHISMS AND DISEASES

Ewa BARTNIK

Zakład Genetyki Uniwersytetu Warszawskiego i Instytut Biochemii i Biofizyki
PAN

Streszczenie: Ludzkie mitochondria zawierają własny genom – małą kolistą cząsteczkę DNA złożoną z 16569 par zasad i kodującą 22 tRNA, 2 rRNA i 13 białek związanych z fosforylacją oksydacyjną. Mitochondria są dziedziczone wyłącznie po matce. Znanych jest szereg chorób dziedziczonych w sposób matczyne, dla których stwierdzono już obecność mutacji punktowych lub delecji w mitochondrialnym DNA. Większość takich DNA koegzystuje w komórce z niezmutowanym DNA mitochondrialnym. W populacji ludzkiej istnieją różne warianty sekwencji DNA mitochondrialnego.

Słowa kluczowe: mitochondrialny DNA, dziedziczenie matczyne, choroby mitochondrialne

Summary: Human mitochondria contain their own genome – a small circular DNA molecule composed of 16569 base pairs which codes for 22 tRNAs, 2 rRNAs and 13 proteins linked with oxidative phosphorylation. Mitochondria are maternally inherited. A number of diseases are known which are transmitted by maternal inheritance and for which point mutations or deletions have been found in the mitochondrial DNA. Most of these DNAs coexist in the cell with unmutated mitochondrial DNA. In the human populations different variants of the mitochondrial DNA sequence are present.

Key words: mitochondrial DNA, maternal inheritance, mitochondrial diseases

W każdej komórce ludzkiego ciała znajdują się mitochondria, na ogół w jednej komórce jest ich kilkaset, a każde mitochondrium zawiera 4–10 cząsteczek kolistego DNA o długości 16569 par zasad (pz). Na tej kolistej cząsteczce zapisana jest informacja o syntezie 13 białek związanych z fosforylacją oksydacyjną, 22 klasach tRNA i 2 klasach rRNA [1]. Mitochondria dziedziczone są wyłącznie po matce,

*Praca finansowana z grantu KBN 4 P05E02612.

w czasie zapłodnienia mitochondria plemnika wnikają wprawdzie do oocytu, ale jest ich znikomo mało (około 50) w porównaniu z około 200000 mitochondriami oocytu.

Olbrzymia większość białek obecnych w mitochondriach – zarówno w cytoplazmie, jak i w błonach – kodowanych jest w genomie jądrowym, transkrypty tych genów ulegają translacji w cytoplazmie, a powstające białka są importowane do mitochondriów.

Znanych jest szereg chorób degeneracyjnych obejmujących mózg, serce, mięśnie, nerki i gruczoły wydzielnicze, które są związane z mutacjami w mitochondrialnym DNA. Najwcześniej wykryto mutacje warunkujące dziedziczny zespół Lebera (*Leber's hereditary optic neuropathy* – LHON) [22], padaczkę miokloniczną z obecnością włókien szmatowatych (*myoclonous epilepsy with ragged red fibers* – MERFF) [19, 23] i encefalopatię mitochondrialną z kwasicą mleczanową i napadami przypominającymi udar mózgu (*mitochondrial encephalopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes* – MELAS) [7]. Znane są też inne choroby i podejrzewa się, że zmiany w mitochondrialnym DNA mogą być odpowiedzialne m.in. za procesy starzenia.

Zmiany w mitochondrialnym DNA mogą być także wywoływane przez mutacje w genach jądrowych – kodujących białka strukturalne mitochondriów lub białka związane z regulacją ich funkcji. Znane są też zmiany w mitochondrialnym DNA – a szczególnie delecje – które występują sporadycznie u danego pacjenta, i nie są stwierdzane u jego rodziny (praca przeglądowa [16]).

W niniejszej pracy chciałabym ograniczyć się tylko do chorób wynikających ze zmian w mitochondrialnym DNA dziedziczonych w sposób matczynej. Ich złożona ekspresja, różnorodność objawów wśród tej samej rodziny i zmieniający się obraz choroby u jednej osoby w czasie jej życia powodują, że na typowe dla innych chorób genetycznych poszukiwanie korelacji genotyp-fenotyp nakłada się tu na genetykę populacji – jako że w komórce obecnych jest wiele mitochondriów i na ogół koegzystują ze sobą DNA niosące patogenną mutację i DNA niezmutowane. Diagnostyka molekularnych przyczyn chorób mitochondrialnych musi więc obejmować nie tylko ustalenie obecności mutacji wywołującej chorobę, ale także badania stosunku zmutowanego do normalnego DNA mitochondrialnego.

Sam mitochondrialny DNA ma znacznie wyższe tempo mutacji niż DNA jądrowy. Przyjmuje się, że wynika to z braku systemów naprawy mitochondrialnego DNA, z braku histonów oraz z obecności dużej ilości wolnych rodników. Mutacje pojawiające się w mitochondrialnym DNA komórek linii płciowej mogą powodować choroby występujące w rodzinie, zaś mutacje pojawiające się w komórkach somatycznych mogą być związane ze spadającą z wiekiem wydolnością układu fosforylacji oksydacyjnej [21].

Zmutowane cząsteczki mtDNA powstające w komórkach linii płciowej współistnieją z normalnymi niezmutowanymi formami mtDNA, jednak wydaje się, że

Tabela 1. Geny mtDNA

Opis genu	Symbole
Podjednostki oksydoreduktazy (dehydrogenaza NADH) – 7 genów apocytochrom b	NADH-Q ND1, ND2, ND3, ND4L, ND4, ND5, ND6 cytb
Podjednostki oksydazy cytochromowej – 3 geny	CO1, CO2, CO3
Podjednostki syntazy ATP – 2 geny	ATPase6, ATPase8
rRNA	12S, 16S
tRNA – 22 geny	

w czasie powstawania gamety żeńskiej istnieje wąskie gardło, w którym liczba cząsteczek mitochondrialnego DNA w jednej komórce jest dość mała [13]. Niedawno stosując myszy zawierające dwa rodzaje cząsteczek mtDNA ustalono, że ta minimalna ilość wynosi około 200 cząsteczek [9]. Być może jest ona jeszcze niższa – u krów opisane są przypadki całkowitej zmiany mitochondrialnego DNA w ciągu jednego pokolenia [11]. Podczas dojrzewania pierwotnego oocytu liczba cząsteczek mtDNA wzrasta około 1000-krotnie, i w czasie tej replikacji może dochodzić do przypadkowej przewagi zmutowanych cząsteczek DNA. Oocyt zawiera około 200000 kopii mitochondrialnego DNA, który ulega replikacji dopiero wtedy, gdy zarodek osiągnie stadium blastocysty.

Dla wielu chorób wynikających z mutacji w mitochondrialnym DNA objawy pojawiają się dopiero u dorosłych, tłumaczy się to nagromadzeniem się defektywnych cząsteczek DNA w pewnych tkankach w miarę rozwoju. Jednak choroby mitochondrialne występują także u dzieci. Ważnym czynnikiem wydaje się być zapotrzebowanie poszczególnych tkanek na sprawnie działającą fosforylację oksydacyjną. Proporcje odziedziczonych normalnych i defektywnych mitochondriów w danej tkance uważa się w zasadzie za przypadkowe, ale nie musi to być do końca prawdziwe. Opisane powyżej myszy zawierające mieszaninę dwóch typów cząsteczek normalnego mitochondrialnego DNA wykorzystano do zbadania segregacji i akumulacji mtDNA w różnych tkankach. Wnioski z tej pracy [10] są dość zaskakujące, ponieważ w niektórych tkankach zachodzi dryf genetyczny, w innych natomiast wydaje się być obecna selekcja preferująca jeden z dwóch typów mtDNA, ale preferencje zależą od tkanki. Praca ta jest bardzo nowa (ukazała się w maju br.) i metodyka w niej zastosowana powinna w przyszłości wyjaśnić, jak segregują mitochondria.

Ustalanie, jakie sekwencje DNA mitochondrialnego są normalne, a jakie zmutowane, wymaga przebadania DNA pewnej ilości osób zdrowych. Sekwencja mitochondrialnego DNA została ustalona już w 1981 r. w grupie Fryderyka Sangera [1], natomiast prace nad wariantami mitochondrialnymi prowadzone są od wczesnych lat osiemdziesiątych. W populacji ludzkiej mitochondrialny DNA był badany głów-

nie techniką polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych, różne populacje wykazują pewne zróżnicowanie, często dotyczące tzw. podstawień neutralnych w sekwencji genów kodujących białka – to znaczy zmiany sekwencji nie zmieniają kodowanego aminokwasu. Badania wykazują brak rekombinacji pomiędzy mitochondrialnymi DNA – dane warianty albo występują razem, albo ich nie ma. Na badaniach tego typu opiera się hipoteza mitochondrialnej Ewy – ponieważ największą różnorodność mitochondrialnego DNA stwierdzono w Afryce, sugeruje to, że inne populacje wywędrowały stamtąd zabierając ze sobą tylko pewne warianty mitochondrialnego DNA [21].

Badania takie są nadal ważne, ukazuje się wiele prac tego typu badających poszczególne populacje [6, 15] szczególnie, że nie wszystkie populacje, m. in. np. polska, zostały przebadane. Wiąże się to ze sprawą mutacji warunkujących choroby – jeżeli stwierdzi się, że chory ma nową, nieznaną zmianę w mitochondrialnym DNA powodującą podstawienie jednego aminokwasu przez drugi, czy jest to polimorfizm, czy choroba [8]? Aby odpowiedzieć na to pytanie, można przeanalizować mitochondrialny DNA wszystkich spokrewnionych po linii żeńskiej członków rodziny chorego, aby ustalić korelację choroba/mutacja albo też trzeba coś wiedzieć o typowym mtDNA w danej populacji.

W tabeli 2 podane są przykładowe mutacje mitochondrialnego DNA powodujące szereg chorób. Jednak warto pamiętać, że wpływ mutacji tego typu jest bardziej skomplikowany do analizy niż mutacji w genach jądrowych. Większość mutacji występuje w formie heteroplazmatycznej, ponadto proporcje normalnych i zmutowanych DNA mogą być różne w poszczególnych tkankach. Istnieją mutacje predysponujące, mutacje powodujące i cała gama mutacji, których efekty mieszczą się między tymi dwoma wariantami.

Znane są mutacje zarówno w genach kodujących białka, jak też rRNA i tRNA. Do 1995 roku poznano 30 mutacji w tRNA, z których 11 dotyczyło tylko jednego genu tRNA^{Leu(UUR)}. Mutacje te powodują różne choroby, np. MELAS i cukrzyca z głuchotą wynikające z tej samej mutacji zamiany A na G w nukleotydzie 3243, czy PEM (postępująca encefalomiopatia) polegająca na delecji jednego nukleotydu w pozycji 3271 w tym samym genie [14]. Mutacja w genie 12S rRNA powoduje występowanie głuchoty, w dwóch rodowodach występowała ona albo samoistnie, albo też w wyniku działania antybiotyków aminoglikozydowych [5].

Z tabeli 2 wynika szereg faktów, świadczących o problemach w korelacjach genotyp/fenotyp. Daną chorobę mogą wywoływać mutacje w różnych genach – na przykład LHON powodowana jest przez mutacje w 6 różnych podjednostkach dehydrogenazy NADH, ale także i w genie apocytochromu b [3]. Z drugiej strony ta sama mutacja może powodować 2 różne choroby – mutacje T->G w pozycji 8993 w podjednostce 6 genu syntazy ATP powoduje albo NARP, albo chorobę o znacznie ostrzejszym przebiegu – zespół Leigha, zaś mutacja w tRNA^{Leu} w pozycji 3243 powoduje cukrzycę z głuchotą lub MELAS. Widać, że mutacje często

Tabela 2. Wybrane mutacje punktowe w DNA mitochondrialnym, które powodują choroby

Nazwa choroby	Skrót	Zmutowany gen	Pozycja mutacji	Zmiana aminokwasu	
Zespół Lebera	LHON	ND1	3394	Y->H	
			3460	A->T	
			4160	L->P	
		ND2	4917	D->N	
			COI	7444	Term->K
			ND4	11778	R->H
			ND5	13708	A->T
			ND6	14484	M->V
cytb	15257	D->N			
Zespół Leigha	SNE	ATPase 6	8993	L->R	
Neuropatia obwodowa z ataksją i barwnikowym zwyrodnieniem siatkówki	NARP	ATPase6	8993	L->R	
Cukrzyca insulinoniezależna z głuchotą	NIDDMD	tRNA ^{Lcu}	3243	tRNA	
Miopatia mitochondrialna	MEM	tRNA ^{Lcu}	3250	tRNA	
Padaczka miokloniczna z obecnością włókien	MERFF	tRNA ^{Lys}	8344	tRNA	
RRF	MERFF/MELAS	tRNA ^{Lys}	8356	tRNA	
Encefalopatia mitochondrialna z kwasicą mleczanową i napadami przypominającymi udar mózgu	MELAS	tRNA ^{Lcu}	3271	tRNA	
		tRNA ^{Lcu}	3243	tRNA	

Stosowane skróty dla aminokwasów: A – alanina, D – kwas asparaginowy, H – histydyna, I – izoleucyna, K – lizyna, L – leucyna, M – metionina, N – asparagina, P – prolina, R – arginina, T – treonina, Y – tyrozyna; dane wg [14 i 20]

nie są jedyną przyczyną choroby i że na efekty danej mutacji mają wpływ nieznanne jeszcze czynniki – najprawdopodobniej sekwencja samego DNA mitochondrialnego i proporcje i dystrybucja do różnych tkanek zmutowanych cząsteczek DNA, jak i genotyp jądrowy. Zdolność do oddychania może zmienić się skokowo – do 85% zmutowanego DNA mitochondrialnego może dawać nikłe objawy, zaś większa ilość – bardzo ciężkie.

Warto jeszcze wspomnieć o innym typie mutacji – o delecjach. Dziedziczona w sposób matczynej cukrzyca z głuchotą związana jest z delecją i duplikacją mitochondrialnego DNA, tak że w komórce współistnieją cząsteczki normalne, z delecją i z duplikacją obejmującą znaczny obszar – aż 10,4 kb [2]. Przykładów takich jest więcej, uważa się, że delecje występują także w czasie starzenia się [17]. Upośledzenie funkcji mitochondriów osób starszych – ale bez badania częstości delecji – wykazano doświadczalnie, przenosząc mitochondria pobrane z komórek osób w różnym wieku i przenosząc je do linii komórkowej nie mającej mitochondriów [12].

Ostatnio duże zainteresowanie wzbudziło stwierdzenie, że u chorych na chorobę

Alzheimerera, którzy zapadają na nią w wieku późnym, występują ze zwiększoną częstością mutacje w genach dwóch podjednostek oksydazy cytochromowej – I i II [4]. Od kilku lat już wiadomo [21], że pewne mutacje, m.in. w genie 12S rRNA, tRNA^{Gln} i ND1, występują częściej u chorych na chorobę Alzheimerera oraz u osób chorych na chorobę Parkinsona niż w przeciętnej populacji, uważane więc były za mutacje w jakiś sposób predysponujące do tych chorób, jednak praca [4] wykazuje silniejsze korelacje pomiędzy mutacjami w dwóch podjednostkach oksydazy cytochromowej i chorobą Alzheimerera. Niestety ze względu na wiek pacjentów – po 60 roku życia – badanie rodowodów jest utrudnione.

Badanie i diagnostyka chorób mitochondrialnych rozwija się bardzo szybko, techniki diagnostyczne wykorzystują zarówno metody biochemii i cytochemii, jak i najnowsze metody biologii molekularnej, na ogół oparte na technikach PCR, które umożliwiają ustalenie, jaka mutacja zaszła i w jakiej części DNA w danej tkance. Ciągłe odkrywa się nowe mutacje mitochondrialne, na przykład niedawno ukazały się doniesienia o nowej mutacji w tRNA^{Lys} powodującej kardiomiopatię i utratę słuchu (zmiana G na A w pozycji 8363) [18] oraz o mutacji A-G w pozycji 12320G w tRNA^{Leu} występującej tylko w mięśniach szkieletowych chorego [24]. Zważywszy, że pierwszą mutację w mtDNA zidentyfikowano zaledwie 9 lat temu, widać, że wiele pozostało jeszcze do wyjaśnienia.

LITERATURA

- [1] ANDERSON S, BANKIER AT, BARRELL BG, DE BRUIJN MHL, COULSON AR, DROUIN J, EPERON IC, NIERLICH DP, ROE BA, SANGER F, SCHREIER PH, SMITH AHJ, STADEN R, YOUNG IG. Sequence of the human mitochondrial genome. *Nature* 1981; **290**: 457–465.
- [2] BALLINGER SW, SHOFFNER JM, GEBHART S, KOONTZ DA, WALLACE DC. Mitochondrial diabetes revisited. *Nature Genetics* 1974; **7**: 458–459.
- [3] BROWN MD, VOLKAVEC AS, LOTT MT, TORRONI A, YANG C-C, WALLACE DC. Mitochondrial DNA complex I and III mutations associated with Leber's hereditary optic neuropathy. *Genetics* 1992; **130**: 163–173.
- [4] DAVIS RE, MILLER S, HERRNSTADT C, GHOSHI SS, FAHY E, SHINOBU LA, GALASKO D, THAL LJ, BEAL MF, HOWELL N, PARKER WD. Mutations in mitochondrial cytochrome oxidase genes segregate with late-onset Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; **94**: 4526–4531.
- [5] EL-SCHAHAWI M, LOPEZ DE MUNAIN A, SARRAZIN AM, SHANSKE AL, BASIRICO M, SHANSKE S, DIMAURO S. Two large Spanish pedigees with nonsyndromic deafness and the mtDNA mutation at nt 1555 in the 12S rRNA gene: evidence of heteroplasmy. *Neurology* 1997; **48**: 453–456.
- [6] FORSTER P, HARDING R, TORRONI A, BANDELT H-J. Origin and evolution of Native American mt DNA variation: a reappraisal. *Am J Hum Genet* 1996; **59**: 935–945.
- [7] GOTO Y, NONAKA I, HORAI S. A mutation in the tRNA^{Leu(UUR)} gene associated with the MELAS subgroup of mitochondrial encephalomyopathies. *Nature* 1990; **346**: 651–653.
- [8] HOWELL N. Mitochondrial gene mutations and human disease: a prolegomenon. *Am J Hum Genet* 1994; **55**: 219–224.

- [9] JENUTH JP, PETERSON AC, FU K, SHOUBRIDGE EA. Random genetic drift in the female germline explains the rapid segregation of mammalian mitochondrial DNA. *Nature Genetics* 1996; **14**: 146–151.
- [10] JENUTH JP, PETERSON AC, SHOUBRIDGE EA. Tissue-specific selection for different mtDNA genotypes in heteroplasmic mice. *Nature Genetics* 1997; **16**: 93–95.
- [11] KOEHLER CM, LINDBERG GL, BROWN DR, BEITZ DC, FREEMAN AE, MAYFIELD JE, MYERS AM. Replacement of bovine mitochondrial DNA by a sequence variant within one generation. *Genetics* 1991; **129**: 247–255.
- [12] LADERMAN KA, PENNY JR, MAZZUCHELLI F, BRESOLIN N, SCARLATO G, ATTARDI G. Aging-dependent functional alterations of mitochondrial DNA (mtDNA) from human fibroblasts transferred into mtDNA-less cells. *J Biol Chem* 1996; **271**: 15891–15897.
- [13] MARCHINGTON DR, HARTSHORNE GM, BARLOW D, POULTON J. Homopolymeric tract heteroplasmy in mtDNA from tissues and single oocytes: support for a genetic bottleneck. *Am J Hum Genet* 1997; **60**: 408–416.
- [14] MUNNICH A, ROTIG A, CHRETIEN D, SAUDUBRAY JM, CORNIER V, RUSTIN P. Clinical presentations and laboratory investigations in respiratory chain deficiency. *Eur J Pediatr* 1996; **155**: 262–274.
- [15] PASSARINO G, SEMINO O, BERNINI LF, SANTACHIARA-BENERECETTI AS. Pre-Caucasoid and Caucasoid genetic features of the Indian population revealed by mtDNA polymorphisms. *Am J Hum Genet* 1996; **59**: 927–934.
- [16] PRONICKA E. Choroby mitochondrialne (cytopatie mitochondrialne) i inne pierwotne kwasice mleczanowe.[w] Pronicka E [red] Postępy w Pediatry, t. 4. Warszawa, Centrum Zdrowia Dziecka 1995, 5: 3–29.
- [17] REYNIER P, MALTHIERY Y. Accumulation of deletions in tDNA during tissue aging: analysis by long PCR. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; **217**: 59–67.
- [18] SANTORELLI FM, MAK S-K, EL-SCHAHAWIM, CASALIC, SHANSKE S, BARAMTZ, MADRID RE, DIMAURO S. Maternally inherited cardiomyopathy and hearing loss associated with a novel mutation in the mitochondrial tRNA^{Lys} gene (G8363A). *Am J Hum Genet* 1997; **58**: 933–939.
- [19] SHOFFNER JM, LOTT MT, LEZZA AM, SELBEL P, BALLINGER SW, WALLACE DC. Myoclonic epilepsy and ragged-red fiber disease (MERFF) is associated with a mitochondrial DNA tRNA^{Lys} mutation. *Cell* 1990; **61**: 931–937.
- [20] WALLACE DC. Mitochondrial diseases: genotype versus phenotype. *Trends Genet* 1993; **9**: 128–133.
- [21] WALLACE DC. Mitochondrial DNA sequence variation in human evolution and disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; **91**: 8739–8746.
- [22] WALLACE DC, SINGH G, LOTT MT, HODGE JA, SCHURR TG, LEZZA AMS, ELSAS IMJ, NIKOSKELAINEN E. Mitochondrial DNA mutation associated with Leber's hereditary optic neuropathy. *Science* 1988; **242**: 1427–1430.
- [23] WALLACE DC, ZHENG X, LOTT MT, SHOFFNER JM, HODGE JA, KELLEY RI, EPSTEIN CM, HOPKINS LC. Familial mitochondrial encephalomyopathy (MERFF): Genetic, pathophysiological and biochemical characterization of a mitochondrial DNA disease. *Cell* 1990; **55**: 601–610.
- [24] WEBER K, WILSON JN, TAYLOR L, BRIERLEY E, JOHNSON MA, TURNBULL DM, BINDOFF LA. A new mtDNA mutation showing accumulation with time and restriction to skeletal muscle. *Am J Hum Genet* 1996; **60**: 373–380.

Otrzymano: –

Przyjęto: 24.06. 1997 r.

Adres autora: Pawińskiego 5a, 02106 Warszawa

REGULACJA SYNTEZY CZYNNIKÓW WIRULENCJI W KOMÓRKACH SZCZEPÓW *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

REGULATION OF VIRULENCE FACTORS GENE EXPRESSION IN *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

Kinga Jadwiga WÓJCIK

Instytut Biologii Molekularnej Uniwersytetu Jagiellońskiego, Kraków

Streszczenie: Patogenność szczepów *Staphylococcus aureus* powodujących wiele schorzeń jest związana głównie z produkcją toksyn. Syntezę czynników wirulencji i innych egzobiałek w komórkach gronkowców kontroluje system globalnej regulacji *agr* oraz *sar* i *xpr*, które modulują odpowiedź *agr*. Ekspresja białek sekrecyjnych ulega aktywacji przez system *agr* w postekspozycyjnej fazie wzrostu, a synteza białek powierzchniowych jest wtedy zahamowana. Locus *agr* zawiera dwie jednostki transkrypcyjne, P2 i P3, z których jedna koduje białka klasycznego dwuskładnikowego systemu transdukcji sygnału oraz jego niskocząsteczkowy aktywator, wydzielany z komórki do środowiska. Operon P3 koduje cząsteczkę efektorową systemu *agr*, RNAIII, regulującą ekspresję genów na poziomie transkrypcji oraz na poziomie translacji, w przypadku przynajmniej jednego lub dwóch egzobiałek. Przedstawiony system regulacji ekspresji genów ma prawdopodobnie swoje odpowiedniki kontrolujące procesy wzrostu i rozwoju komórek podlegające autoindukcji w populacji innych rodzajów bakterii. Poznanie mechanizmów regulacji ekspresji genów patogenności może przyczynić się do lepszego kontrolowania zakażeń bakteryjnych przez supresję wirulencji szczepów.

Słowa kluczowe: *Staphylococcus aureus*; *agr*; wirulencja bakterii

Summary: The pathogenesis of *Staphylococcus aureus* which cause a variety of diseases, involves primarily the production and secretion of toxins. The synthesis of virulence factors and other exoproteins by *S.aureus* is controlled by a global regulatory system *agr*, and in addition by loci *sar* and *xpr* which modulate *agr* response. Expression of secreted proteins is activated in postexponential growth phase, when synthesis of surface proteins is rather inhibited. Locus *agr* contains two transcription units, driven by promoters P2 and P3. P2 transcript encodes proteins of the classical bacterial two-component transduction system and autocrine factor which activate *agr* response. P3 operon encodes RNAIII, which is the effector of this system. RNAIII regulates target gene expression at transcriptional level and, by an independent mechanism, stimulates translation of at least one or two of the exoproteins. This described

regulatory system probably has analogs in the other bacterial strains. Recognition of mechanisms of virulence genes' expression may help to control bacterial infections by suppression of their virulence.

Key words: *Staphylococcus aureus*; agr; bacterial virulence

Po wnikięciu patogenów do organizmu gospodarza oddziałują na nie różnorodne nowe bodźce środowiskowe, które wzbudzają syntezę czynników wirulencji, pomagających drobnoustrojom w przeżyciu w nowym środowisku. Poznanie drogi inicjacji i kontroli syntezy czynników zjadliwości jest niezbędne dla zrozumienia początków powstania chorób, a tym samym skutecznej walki z nimi, np. przez zaprojektowanie efektywnych szczepionek i nowych środków przeciwbakteryjnych.

W związku ze zwiększającą się ciągle opornością na antybiotyki szczepów bakterii gramdodatnich, *Staphylococcus aureus* pozostaje nadal groźną dla człowieka bakterią patogenną, będącą przyczyną wielu chorób, takich jak: zapalenie wsierdza, zapalenie stawów, zapalenie szpiku kostnego czy też zespół szoku toksycznego. Uważa się, że patogenność gronkowców polega przede wszystkim na wytwarzaniu i sekrecji toksyn, które uszkadzają komórki gospodarza lub nawet powodują ich lizę i/lub interferują z systemem odporności makroorganizmu. Listę ważniejszych czynników produkowanych przez gronkowce przedstawia tabela 1. Enterotoksyny, toksyna epidermolityczna i TSST-1 mają własności superantygenów. Wiążą się do białek kompleksu zgodności tkankowej MHC klasy II i stymulują niespecyficzną odpowiedź limfocytów T. Z drugiej strony, wydzielane przez patogen enzymy m.in. lipazy, nukleazy, proteazy, hialuronidaza degradują składniki tkanki. Wiele egzobiałek ulega sekrecji podczas postekspozycyjnej fazy wzrostu komórki [1]. Białka związane ze ścianą komórkową *S. aureus* reagują ze specyficznymi cząsteczkami gospodarza, czego konsekwencją jest maskowanie powierzchni bakterii przed systemem odporności i/lub adhezja patogenu do tkanki gospodarza. Białkami ekspozowanymi na komórkach gronkowców są: adhezyny kolagenu, fibrynogenu (*clumping factor*), fibronektyny i scharakteryzowane niedawno białko receptorowe zdolne do wiązania kilku zewnątrzkomórkowych białek eukariotycznych: fibrynogenu, lamininy, plazminogenu, vitronektyny, trombospondyny i sialoproteiny kości [7]. Związane ze ścianą komórki gronkowca białko A ma zdolność wiązania fragmentów Fc cząsteczek immunoglobulin, interferując z opsonofagocytozą mikroorganizmów, co sprawia, że uważa się je za ważny czynnik wirulencji. Synteza pewnych białek powierzchniowych, np. białka A, fibrynogenu lub białka wiążącego fibronektynę ulega represji w fazie postekspozycyjnej [1, 19].

Ekspresja czynników wirulencji jest często regulowana przez systemy globalnej regulacji, w których te same cząsteczki regulatorowe kontrolują aktywność licznych genów i operonów w odpowiedzi na różnorodne bodźce pochodzące ze środowiska. Do takich sygnałów należą m.in. zmiany temperatury, osmotyczności, pH, stężenia jonów, poziomu tlenu, dostępności żelaza, brak czynników odżywczych itp. Czynniki te indukują reorganizację metabolizmu komórki, zahamowanie wzrostu, czyli prze-

Tabela 1. Czynniki patogenności szczepów *Staphylococcus aureus*

Rodzaj czynnika	Przykłady
Toksyny	hemolizyny α^* , β^* , γ i δ^* leukocydyna* enterotoksyny A, B*, C, D*, E, F toksyna epidermolityczna A*, B* toksyna szoku toksycznego 1*
Enzymy	proteazy: proteinaza serynowa*, metaloproteinaza* nukleazy* lipazy* hialuronidaza* stafylokinaza* koagulaza*
Białka powierzchniowe	białko wiążące kolagen białko wiążące fibrynogen białko wiążące fibronektynę* białko wiążące: lamininę, plazminogen, vitronektynę, trombospondynę, sialoproteinę białko A*

Białka, dla których wykazano, że pod koniec fazy logarytmicznej ich ekspresja ulega: indukcji (*), zahamowaniu (^)

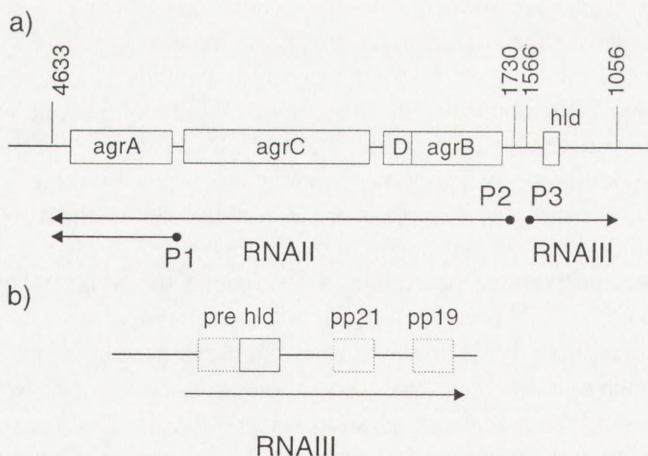
ścia komórki do fazy postekspansyjnej. W tym czasie następuje szybka synteza grupy białek, z których wiele ulega sekrecji. U bakterii patogennych wiele syntetyzowanych wtedy egzobiałek stanowi czynniki wirulencji, toksyny i enzymy, ułatwiając im przeżycie, namnożenie i rozprzestrzenianie w zainfekowanej tkance. W tym samym czasie zahamowaniu ulega produkcja licznych białek powierzchniowych, syntetyzowanych podczas fazy ekspansyjnej [15, 17].

Aktywacja genów należących do różnych regulonów odbywa się za pośrednictwem dwuskładnikowego systemu transdukcji sygnału, a białka niezbędne w tym procesie mają sekwencje konserwowane ewolucyjnie [22]. Typowy system transdukcji sygnału u bakterii składa się z receptora sygnału, który jest białkiem błony i białka regulatorowego, obecnego w cytoplazmie. N-koniec białka sensorowego położony na zewnątrz komórki lub też peryplazmatycznie odpowiada na sygnał ze środowiska. Odbierany przez nie bodziec powoduje allosteryczną modyfikację białka, przekazywaną do jego końca C. Następuje aktywacja kinazy histydynowej, która fosforyluje własną specyficzną histydyne, po czym fosforan ulega przeniesieniu na kwas asparaginowy N-końca cytoplazmatycznego białka regulatorowego. Prowadzi to z kolei do zmiany allosterycznej białka regulatorowego wywołującej konwersję domeny C-końcowej w ten sposób, że wiążąc się z DNA może ona bezpośrednio wpływać na transkrypcję genów docelowych [8].

W komórkach *S. aureus* wykryto i scharakteryzowano policistronowy system globalnej regulacji ekspresji genów wirulencji i syntezy innych egzobiałek, nazwany *agr* (ang. *accessory gene regulator*) oraz dwa dodatkowe loci *sar* (ang. *staphylococcus accessory regulator*) i *xpr* (ang. *extracellular protein regulator*), które najprawdopodobniej modulują aktywność locus *agr* [4, 25, 26].

Locus *agr* zawiera dwie rozbieżne jednostki transkrypcyjne, RNAII i RNAIII, kontrolowane przez dwa leżące obok siebie promotory P2 i P3 (rys. 1a) [13,23]. Operon o wielkości ok. 3 kb kontrolowany przez promotor P2 składa się z czterech genów *agrA*, *agrB*, *agrC* i *agrD*, których ekspresja jest niezbędna dla aktywacji promotora P3 transkryptu RNAIII. RNAIII jest cząsteczką regulacyjną systemu *agr*. Ekspresja operonu P2 podlega autokatalitycznej aktywacji. P1 ulokowany przy 5' końcu *agrA* jest słabym promotorem konstytutywnym. Produkt genu *agrA* wykazuje podobieństwo do białka regulatorowego klasycznego dwuskładnikowego systemu transdukcji sygnału. Natomiast białko AgrC odpowiada transduktorowi sygnału kinazy histydynowej. Jest więc ono receptorem dla zewnątrzkomórkowego aktywatora. Jak wykazała Morfeld i wsp. [20], białko AgrA nie oddziałuje bezpośrednio z DNA regionu promotorów P2-P3. Prawdopodobnie aktywuje ono inne białko mające zdolność regulacji aktywności tych promotorów. Natomiast produkt locus *sar* ma zdolność wiązania się z DNA w regionie promotora P2 operonu, kontrolując transkrypcję RNAII [9].

Porównując *agr* i klasyczny system transdukcji sygnału u bakterii Balaban i Novick [2] stwierdzili, że aktywacja *agr* jest zainicjowana przez sygnał pochodzący ze środowiska, ale generowany podczas wzrostu populacji bakterii. W toku badań potwierdzających tę hipotezę wyizolowano krótki peptyd, feromon. Składa się on

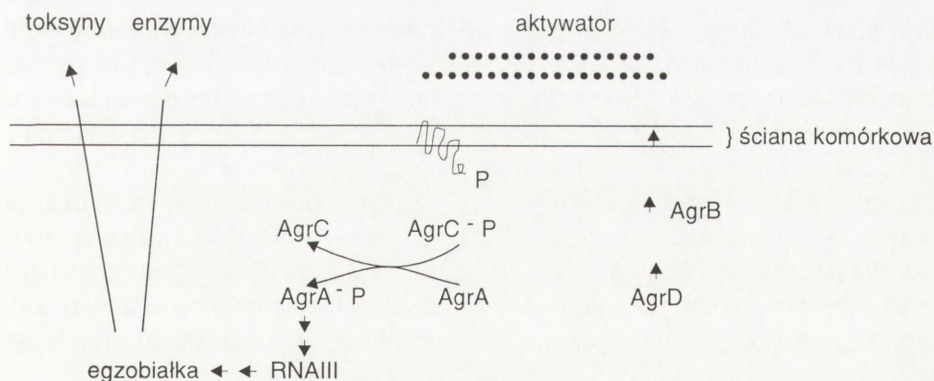


Rys. 1. Organizacja locus *agr* w komórkach szczepów *Staphylococcus aureus* (wg [24] zmodyfikowano): strzałkami oznaczono główne transkrypty RNAII i RNAIII oraz transkrypt z promotora P1; położenie genów – prostokątami narysowanymi linią ciągłą, a potencjalne ramki odczytu, których produktów translacji nie zidentyfikowano – linią przerywaną; pionowe kreski wskazują położenie locus *agr* na mapie chromosomu *S. aureus*

z ośmiu aminokwasów, w tym jednego cyklicznego bezwodnika, niezbędnego dla utrzymania jego aktywności i zapobiegania dimeryzacji cząsteczki. Porównanie sekwencji aminokwasowej feromonu z hipotetyczną sekwencją białek kodowanych przez *agrB* i *agrD* wykazało jego identyczność z fragmentem produktu genu *agrD*. Feromon może więc powstawać po obróbce dużego, 46-aminokwasowego peptydu AgrD. Białkiem uczestniczącym w procesie obróbki jest najprawdopodobniej produkt genu *agrB*, a receptorem dla peptydowego feromonu – AgrC. Stwierdzono także, że system regulacji *agr* reaguje m. in. na wzrost gęstości komórek [10]. Peptydowy feromon jest stopniowo akumulowany w środowisku podczas wzrostu komórek. Gdy jego stężenie przekroczy wartość progową, następuje gwałtowna aktywacja systemu *agr*. Naturę tego zjawiska można wytłumaczyć w ten sposób, że do aktywacji systemu może być niezbędne pobudzenie przez feromony wielu receptorów AgrC lub też że wymagana jest oligomeryzacja związanych w błonie receptorów. Model aktywacji systemu regulatorowego *agr* przedstawiono na rysunku 2.

Operon P2 ulega w pewnym sensie podwójnej autokatalitycznej aktywacji. Po pierwsze koduje AgrD, swój wewnętrzny aktywator w formie zmodyfikowanego oktapeptydu, który jest ligandem dla receptora sygnału, białka sensorowego AgrC, także kodowanego przez ten sam operon. Po drugie, główną funkcją syntetyzowanych białek operonu jest aktywacja swego własnego promotora, a także promotora P3. Efektem tej podwójnej aktywacji jest gwałtowna ekspresja RNAIII.

RNAIII jest cząsteczką efektorową odpowiedzi *agr*. Ma ona wielkość 514 nukleotydów i zawiera 4 potencjalne ramki odczytu: *pre-hld*, *hld*, kodująca peptyd hemolizynę δ , której ekspresja jest również regulowana przez *agr*, pp19 i pp21 (rys. 1b) [24]. Wszystkie one, z wyjątkiem pp19, mają wiarygodne sekwencje Shi-



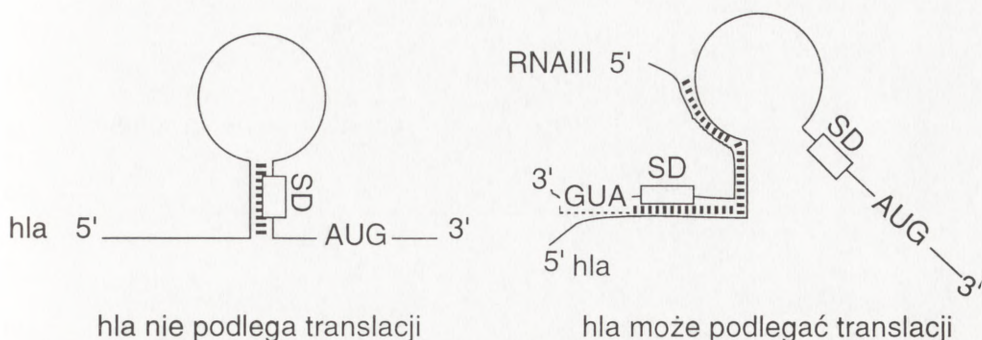
Rys. 2. Proponowany model aktywacji systemu regulatorowego *agr* i jego wpływ na syntezę czynników wirulencji (wg [2] zmodyfikowano): aktywator produkowany i wydzielany przez bakterię (najprawdopodobniej powstaje po obróbce AgrD, w której udział bierze AgrB), przyłącza się do błonowego białka receptorowego AgrC (podobnego do transduktora sygnału w dwuskładnikowym systemie transdukcji sygnału), które z kolei fosforyluje białko AgrA (podobne do białka regulatorowego dwuskładnikowego systemu transdukcji sygnału); następuje aktywacja transkrypcji cząsteczki RNAIII, która reguluje ekspresję egzobiałek

ne-Dalgarno, wskazujące na możliwość ich translacji. Jednakże inaktywacja każdej z tych potencjalnych ramek odczytu nie wpływa na regulacyjną funkcję RNAIII. Świadczy to o tym, że sama cząsteczka RNAIII, a nie któryś z produktów jej translacji, jest efektem regulującym ekspresję genów. Natomiast insercja transpozonu w regionie 3' końca cząsteczki RNAIII hamuje aktywność systemu *agr*. Analiza komputerowa sekwencji cząsteczki RNAIII wykazała jej wyraźną oś symetrii i parowanie 5' i 3' końców [24]. Cząsteczka RNAIII jest syntetyzowana w mid-eksponencjalnej fazie wzrostu, a regulowane przez nią dodatnio geny ulegają ekspresji ok. 2 godz. później, w fazie post-eksponencjalnej [3]. Sugeruje to, że dla aktywacji RNAIII wymagana jest jej potranskrypcyjna modyfikacja. Balaban i Novick [3] nie zdołali jednak wykryć obróbki RNAIII, tj. jej zmian delecyjnych. Postulują oni konieczność istnienia w komórce wolno działającego czynnika, który umożliwiłby przemianę strukturalną cząsteczki do formy ulegającej translacji. RNAIII, najprawdopodobniej przy udziale czynników białkowych, działa przede wszystkim na inicjację transkrypcji genu docelowego tworząc wielofunkcyjne kompleksy nukleo-proteinowe, wiążące się z regionem promotorowym genów. W posteksponencjalnej fazie wzrostu komórki aktywacji ulegają geny białek sekrecyjnych, a represji geny syntezy białek powierzchniowych *S.aureus*.

Dodatkowo, cząsteczka RNAIII aktywuje translację przynajmniej dwóch egzobiałek, α -toksyny i TSST-1 [21]. Translacja i transkrypcja są wtedy regulowane niezależnie. Regulacja translacji następuje wprost przez interakcję cząsteczki RNAIII z transkryptem genu docelowego. Cząsteczka RNAIII zachowuje się jak kodowany *in trans* (tj. w zupełnie innym miejscu genomu) antysensowny RNA. Wiązanie między jej 5' końcem i 5' końcem docelowego mRNA następuje w jego regionie Shine-Dalgarno, tj. sekwencji wiążącej rybosom (rys. 3). Region ten w badanej przez Morfeldt i wsp. [21] cząsteczce mRNA α -toksyny tworzy strukturę szpilki do włosów, uniemożliwiając wiązanie rybosomu. Natomiast sparowanie go z cząsteczką RNAIII zapobiega tworzeniu tej struktury i udostępnia rybosomom sekwencje SD. Efektorowa cząsteczka RNAIII jest pierwszą poznaną, która działając na zasadzie antysensownego RNA stymuluje translację genu.

Przedstawiony model regulacji wymaga istnienia dodatkowego czynnika, prawdopodobnie białkowego, który przez reakcję z RNAIII mógłby ją w razie potrzeby unieczynniać [24]. RNAIII jest cząsteczką długo żyjącą, z $t_{1/2} = 15$ min. Przypuszcza się, że dobrze funkcjonujący system *agr* wymaga wysokiego stężenia RNAIII, której liczba kopii w posteksponencjalnej fazie wzrostu komórki wzrasta 40-krotnie. Prawdopodobnie cząsteczka RNAIII ma niską aktywność.

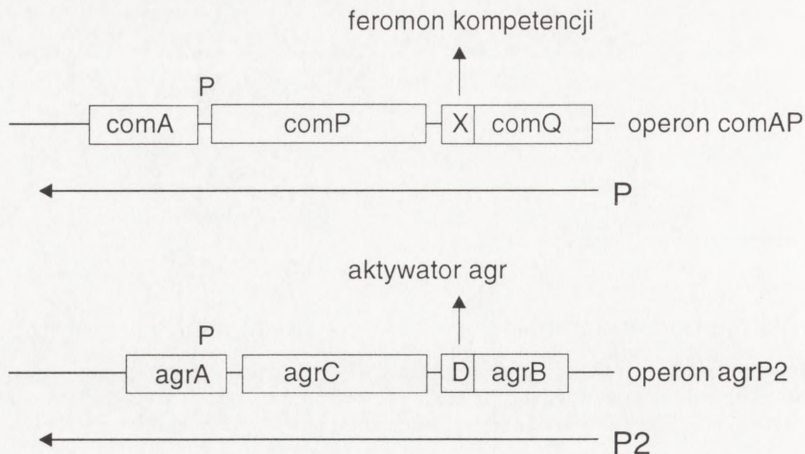
Nie zauważono znaczących podobieństw między sekwencją białek *agr* i innymi poznanymi białkami lub peptydami, występującymi u bakterii. Jednakże porównanie operonu P2 z operonem *comAP* z *Bacillus subtilis* wykazuje uderzające podobieństwo organizacji (rys. 4). Operon *comAP* aktywowany w posteksponencjalnej fazie wzrostu indukuje stan kompetencji, niezbędny dla pobrania egzogennej DNA [16]. Kom-



Rys. 3. Model translacyjnej regulacji przez cząsteczkę RNAIII genu *hla* kodującego – toksynę (wg [21] zmodyfikowano): pokazano wewnątrzcząsteczkowe parowanie zasad w mRNA α -toksyny, które blokuje sekwencje Shine-Dalgarno (SD) oraz interakcję mRNA *hla* z cząsteczką RNAIII

petentne komórki wytwarzają białka zdolne do wiązania i pobrania ze środowiska cząsteczek DNA, bez względu na ich sekwencję nukleotydową. Do komórki wnika jedna nić DNA, podczas gdy druga ulega degradacji na zewnątrz komórki. Białka Com A i ComP tworzą dwuskładnikowy system transdukcji sygnału. Białko ComX ulega obróbce do nonapeptydu, stanowiącego feromon, w której uczestniczy ComQ. Identyfikacja genetycznej organizacji loci *com* i *agr* może oznaczać ich wspólne pochodzenie. Wzajemnego kontaktu między komórkami *B. subtilis* wymaga także inicjacja sporulacji [27]. Można przytoczyć wiele przykładów kontaktowania się pomiędzy komórkami w procesach wzrostu i rozwoju, m.in. takich jak: biosynteza streptomycyny i sporulacja u *Streptomyces*, rozwój kompetencji u *Streptococcus pneumoniae*, bioluminescencja u *Vibrio* [6, 11, 12, 18]. Proces tworzenia ciałek owocowych i sporulacji u *Myxococcus xanthus* wymaga kilku różnych sygnałów pochodzących z zewnątrz komórki [14]. Podobnie, przekazanie plazmidu między komórkami szczepów *Enterococcus faecalis* indukowane jest przez peptydowe feromony, produkowane w komórkach biorcy, gotowego przyjąć plazmid [5]. Bardzo prawdopodobne, że opisany w *S. aureus* i *B. subtilis* moduł regulacyjny *agr* i *com*, wrażliwy m.in. na gęstość, jest szeroko rozpowszechniony wśród bakterii.

Poznanie mechanizmów ekspresji wirulencji może okazać się przydatne do walki z infekcjami bakteryjnymi. Balaban i Novick [2] stwierdzili, że przeciwciała skierowane przeciw peptydowemu aktywatorowi systemu *agr* (czyli feromonowi), blokują odpowiedź *agr*. Ze zmutowanego szczepu *S. aureus exp⁻* wyizolowali także mały peptyd będący inhibitorem systemu *agr*, nazwany RIP (ang. *RNAIII inhibitory peptide*), który współzawodniczy z aktywatorem i może być jego mutacyjną pochodną. Otwierają się więc nowe możliwości kontrolowania infekcji bakteryjnych przez interferencję z ekspresją wirulencji szczepów. Supresja wirulencji nie zabijałaby bakterii, ale raczej zapobiegałaby ekspresji czynników patogenności, interferowałaby ze zdolnością do ich osiedlania się w tkance i produkcji toksyn. Być może supresja



Rys. 4. Porównanie operonu *comAP* kodującego białka biorące udział w regulacji kompetencji komórek *Bacillus subtilis* i *agrP2* kodującego białka odpowiedzialne za aktywację ekspresji cząsteczki RNAIII regulatorowego systemu *agr* w komórkach *Staphylococcus aureus* (wg [10] zmodyfikowano): prostokąty określają położenie genów, poziomymi strzałkami oznaczono transkrypty; geny *comQ* i *comX* są niezbędne do produkcji feromonu kompetencji; geny *comP* i *comA* kodują odpowiednio, kinazę histydynową i białko regulatorowe dwuskładnikowego systemu transdukcji sygnału; geny *agrB* i *agrD* są odpowiedzialne za wytworzenie aktywatora systemu *agr*, a geny *agrC* i *agrA* kodują kolejno, białko podobne do kinazy histydynowej i do białka regulatorowego dwuskładnikowego systemu transdukcji sygnału

wirulencji nie wytwarzałyby tak silnej presji selekcyjnej, która zwykle indukuje powstanie nowych szczepów opornych na stosowane czynniki bakteriobójcze lub bakteriostatyczne.

LITERATURA

- [1] ARVIDSON SO. Extracellular enzymes from *Staphylococcus aureus*. [w] Easmon CF, Adlam C [red.] *Staphylococci and staphylococcal infections*. London: Academic Press 1983: 745–808.
- [2] BALABAN N, NOVICK RP. Autocrine regulation of toxin synthesis by *Staphylococcus aureus*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; **92**: 1619–1623.
- [3] BALABAN N, NOVICK RP. Translation of RNAIII, the *Staphylococcus aureus agr* regulatory RNA molecule, can be activated by a 3'- end deletion. *FEMS Microbiol Lett* 1995; **133**: 155–161.
- [4] CHEUNG AL, PROJAN SJ. Cloning and sequencing of *sar A* of *Staphylococcus aureus*, a gene required for the expression of *agr*. *J Bacteriol* 1994; **176**: 4168–4172.
- [5] CLEWELL DB. Bacterial sex pheromone-induced plasmid transfer. *Cell* 1993; **73**: 9–12.
- [6] DUNNY GM, LEONARD BAB, HEDBERG PJ. Pheromone – inducible conjugation in *Enterococcus faecalis*: interbacterial and host-parasite chemical communication. *J Bacteriol* 1995; **177**: 871–876.
- [7] FOSTER TJ, McDEVITT D. Surface-associated proteins of *Staphylococcus aureus*: Their possible roles in virulence. *FEMS Microbiol Lett* 1994; **118**: 199–206.
- [8] GROSS R. Signal transduction and virulence regulation in human and animal pathogens. *FEMS Microbiol Rev* 1993; **104**: 301–326.

- [9] HEINRICHS JH, BAYER MG, CHEUNG AL. Characterization of the *sar* locus and its interaction with *agr* in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 1996; **178**: 418–423.
- [10] JI G, BEAVIS RC, NOVICK RP. Cell density control of staphylococcal virulence mediated by an octapeptide pheromone. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; **92**: 12055–12059.
- [11] KAISER D. Bacteria also vote. *Science* 1996; **272**: 1598–1599.
- [12] KAISER D, LOSICK R. How and why bacteria talk to each other. *Cell* 1993; **73**: 873–885.
- [13] KORNBLUM J, KREISWIRTH BN, PROJAN SJ, ROSS H, NOVICK RP. *Agr*: a polycistronic locus regulating exoprotein synthesis in *Staphylococcus aureus*. [w] Novick RP [red.] *Molecular Biology of the Staphylococci*. New York: VCH Publishers NY 1990: 373–402.
- [14] KUSPA A, PLAMANN L, KAISER D. Identification of heat-stable A-factor from *Myxococcus xanthus*. *J Bacteriol* 1992; **174**: 3319–3326.
- [15] LONG SR, STASKAWICZ BJ. Prokaryotic plant parasites. *Cell* 1993; **73**: 921–935.
- [16] MAGNUSON R, SOLOMON J, GROSSMAN AD. Biochemical and genetic characterization of a competence pheromone from *B. subtilis*. *Cell* 1994; **77**: 207–216.
- [17] MEKALANOS JJ. Environmental signals controlling expression of virulence determinants in bacteria. *J Bacteriol* 1992; **174**: 1–7.
- [18] MEL SF, MEKALANOS JJ. Modulation of horizontal gene transfer in pathogenic bacteria by *in vivo* signals. *Cell* 1996; **87**: 795–798.
- [19] MORFELDT E, JANZON L, ARVIDSON S, LÖFDAHL L. Cloning of a chromosomal locus (*exp*) which regulates the expression of several exoprotein genes. *Mol Gen Genet* 1988; **211**: 435–440.
- [20] MORFELDT E, PANOVA-SAPUNDJIEVA I, GUSTAFSSON B, ARVIDSON S. Detection of the response regulator AgrA in the cytosolic fraction of *Staphylococcus aureus* by monoclonal antibodies. *FEMS Microbiol Lett* 1996; **143**: 195–201.
- [21] MORFELDT E, TAYLOR D, von GABAIN A, ARVIDSON S. Activation of alpha-toxin translation in *Staphylococcus aureus* by the trans-encoded antisense RNA, RNAIII. *EMBO J* 1995; **18**: 4569–4577.
- [22] NIXON BT, RONSON CW, AUSUBEL FM. Two-component regulatory systems responsive to environmental stimuli share strongly conserved domains with the nitrogen assimilation regulatory genes *nrB* and *nrC*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; **83**: 7850–7854.
- [23] NOVICK RP, PROJAN SJ, KORNBLUM J, ROSS HF, JI G, KREISWIRTH B, VANDE- NESCH F, MOGHAZEH S. The *agr* P2 operon: an autocatalytic sensory transduction system in *Staphylococcus aureus*. *Mol Gen Genet* 1995; **248**: 446–458.
- [24] NOVICK RP, ROSS HF, PROJAN SJ, KORNBLUM J, KREISWIRTH B, MOGHAZEH S. Synthesis of staphylococcal virulence factors is controlled by a regulatory RNA molecule. *EMBO J* 1993; **12**: 3967–3975.
- [25] RESCEI P, KREISWIRTH B, OREILLY M, SCHLIEVERT P, GRUSS A, NOVICK RP. Regulation of exoprotein gene expression in *Staphylococcus aureus* by *agr*. *Mol Gen Genet* 1986; **202**: 58–61.
- [26] SMELTZER MS, HART ME, IANDOLO JJ. Phenotypic characterization of *xpr*, a global regulator of extracellular virulence factors in *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun* 1993; **61**: 919–925.
- [27] WALDBURGER C, GONZALEZ D, CHAMBLISS GH. Characterization of a new sporulation factor in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 1993; **175**: 6321–6327.

Otrzymano: –

Przyjęto: 24.06. 1997 r.

Adres autora: Al. Mickiewicza 3, 31-120 Kraków

ILOŚCIOWE METODY ANALIZY OBRAZU W GENETYCE MOLEKULARNEJ*

APPLICATIONS OF COMPUTER-ASSISTED IMAGE ANALYSIS TO MOLECULAR GENETICS

Zbigniew MADEJA

Zakład Biologii Komórki, Instytut Biologii Molekularnej im. J. Zurzyckiego
Uniwersytetu Jagiellońskiego, Kraków

Streszczenie: W artykule omówiono wybrane zastosowania komputerowej analizy obrazu w genetyce molekularnej. Dokonano przeglądu zastosowań analizy obrazu w badaniach wykorzystujących: technikę fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (FISH), porównawczą hybrydyzację genomów (CGH), elektroforezę jąder pojedynczych komórek (*Comet assay*) oraz ilościową ocenę zawartości substancji w prążkach elektroforetycznych. W pracy przedstawiono podstawowe założenia stosowanych metod oraz przykłady ich zastosowania w biologii i medycynie.

Słowa kluczowe: Analiza obrazu, FISH, porównawcza hybrydyzacja genomów

Summary: The paper reviews some applications of computer-assisted image analysis to molecular genetics. The current status of image analysis in fluorescence *in situ* hybridization (FISH), comparative genomic hybridization (CGH) and comet assay analysis is discussed. The limitations and advantages of the presented methodology are considered.

Key words: Image analysis, FISH, comparative genomic hybridization

I. WSTĘP

W genetyce molekularnej najczęściej obecnie stosowanymi metodami badawczymi są analizy biochemiczne. W wyniku stosowania takiego podejścia metodologicznego otrzymywane rezultaty są najczęściej wypadkową zróżnicowanych sygnałów pochodzących z wielu, często różniących się pod wieloma względami

*Praca finansowana w ramach grantu KBN 6 P204 057 07.

komórek. Konsekwencją tego jest otrzymywanie wyników, które nie odzwierciedlają stanu pojedynczej komórki, a jedynie prezentują średnią wartość (niekiedy nie odpowiadającą żadnej realnie istniejącej komórce) dla całej populacji. Z tego względu coraz większym zainteresowaniem wśród biologów cieszą się metody pozwalające prowadzić badania na pojedynczych komórkach. W biologii komórki od dawna postulowano konieczność tego typu badań przy użyciu metod analizy ilościowej [32]. Jednak dopiero na przełomie lat 1980 i 1990, dzięki pojawieniu się na rynku stosunkowo tanich i szybkich komputerów osobistych, kamer CCD oraz przetworników obrazu na zapis cyfrowy możliwe stało się stworzenie wydajnych i powszechnie dostępnych systemów komputerowej analizy obrazu.

Obecnie takie systemy znajdują zastosowanie w wielu dziedzinach biologii. Omówienie zastosowań i zasady działania metod komputerowej analizy obrazu można znaleźć w wielu pracach przeglądowych [1, 3, 26, 28, 33, 43]. Główne kierunki wykorzystania tych metod do analizy obrazów mikroskopowych dotyczą fotometrycznych oznaczeń ilości różnych składników komórki [2, 5, 8, 9, 12, 13, 15, 39] oraz morfometrycznej analizy kształtu [2, 6, 7, 16, 24, 30, 31].

W prezentowanym artykule przedstawionych zostanie kilka wybranych zastosowań komputerowej analizy obrazu do badań związanych z genetyką molekularną.

II. BUDOWA UKŁADU DO ANALIZY OBRAZU

Stosowane w badaniach genetycznych systemy do analizy obrazu praktycznie nie różnią się od tego typu układów używanych do analizy obrazów mikroskopowych w biologii komórki. Podstawowym elementem takiego układu jest mikroskop fluorescencyjny. W przypadku pracy z sygnałami o małej intensywności świecenia, z jakimi najczęściej mamy do czynienia w badaniach genetycznych, najbardziej przydatne są mikroskopy z obiektywami imersyjnymi o maksymalnie dużej aperturze numerycznej. Istotne jest również, aby autofluorescencja olejku imersyjnego, jak również układu optycznego mikroskopu były ograniczone do minimum. Jest to szczególnie ważne przy stosowaniu wysoko czułych kamer CCD ze zdolnością do integracji obrazu, ponieważ mogą one osiągnąć optymalną czułość tylko wtedy, gdy świecenie tła jest zanedbywalne [47]. Mikroskop powinien być również wyposażony w przynajmniej trzy zestawy filtrów fluorescencyjnych lub luster dichroicznych do obserwacji w najczęściej używanych zakresach długości światła wzbudzenia i emisji; UV/niebieski (np. DAPI), niebieski/zielony (np. fluoresceina), zielony/czerwony (np. rodamina). Bardzo istotne jest, szczególnie przy badaniach wymagających dużej rozdzielczości, takich jak np. mapowanie genetyczne, aby poszczególne zestawy filtrów były tak dopasowane mechanicznie i oprogramowane, aby nie następowało zjawisko przesuwania się obrazów względem siebie przy zmianie

filtrów [17, 47]. Zjawisko to można również wyeliminować przez zastosowanie filtrów wielopasmowych, które są w stanie przepuszczać jednocześnie dwa lub trzy pasma światła wzbudzenia i emisji. Jednak ten typ filtrów wymaga stosowania do analizy obrazu kamer kolorowych.

Kolejnym ważnym elementem układu aparatury mającym wpływ na jakość analizy obrazu jest kamera. W zależności od planowanego zastosowania oraz posiadanych środków można używać stosunkowo tanich, ale charakteryzujących się niską czułością kamer CCD pracujących w trybie konwencjonalnych kamer video. Ten typ kamer nie jest oczywiście wystarczająco czuły do analizy obrazów o niskiej intensywności świecenia, jak np. obiekty barwione w analizie FISH lub CGH. Ponadto charakterystyczny dla tego typu kamer jest mały zakres dynamiczny (z reguły 6–7 bitów, tj. 64 do 128 poziomów szarości), co nie pozwala na porównywanie sygnałów znacznie od siebie różniących się intensywnością [49]. Istnieje jednak wiele udoskonalonych tego typu kamer charakteryzujących się lepszymi parametrami [49]. Alternatywę (pomijając niektóre udoskonalone kamery video) stanowią dużo droższe, stosowane od dawna w astronomii, chłodzone kamery CCD pozwalające na integrację padającego światła przez długi czas. Kamery tego typu charakteryzują się bardzo wysoką czułością i rozdzielczością oraz wykazują liniowość w bardzo dużym zakresie (12–16 bitów, tj. 4096–65536 poziomów szarości) [4, 44, 47, 49]. Ostatnio pojawiły się na rynku kamery specjalnie projektowane do analizy obrazów wielobarwnych wykorzystywanych w analizach typu FISH lub CGH. Kamery te mają niezależne układy do detekcji każdego z kolorów podstawowych [47]. Przy stosowaniu tego typu kamer nie jest konieczne używanie kosztownych, sterowanych komputerowo urządzeń do automatycznej zmiany filtrów.

Pozostałe elementy systemu analizy obrazu stanowią: przetwornik analogowo-cyfrowy, komputer oraz oprogramowanie, tworzone często pod kątem określonego zastosowania posiadanego systemu.

III. HYBRYDYZACJA *IN SITU* Z ZASTOSOWANIEM SOND ZNAKOWANYCH FLUORESCENCYJNIE

Jedną z technik genetycznych, w których znalazła zastosowanie cytometria obrazowa, jest hybrydyzacja *in situ*, a szczególnie jej wersja oparta na uwidacznianiu sond molekularnych za pomocą barwników fluorescencyjnych (ang. *fluorescence in situ hybridization* – FISH). Hybrydyzacja *in situ* pozwala na detekcję specyficznych sekwencji nukleotydowych w morfologicznie nienaruszonych komórkach bądź chromosomach [52, 53]. Początkowo w technice tej stosowano sondy radioaktywne. Ten typ sond charakteryzuje się dużą czułością, ale ograniczoną rozdzielczością związaną z wielkością ziaren emulsji fotograficznej. Ponadto stosowanie tych metod

uniemożliwia jednocześnie użycie kilku różnych sond. W praktyce dużo wydajniejsze okazało się stosowanie sond znakowanych fluorescencyjnie. Umożliwiło to dokładniejszą lokalizację badanych sekwencji, jak również stosowanie takich procedur umożliwiło jednocześnie śledzenie losu kilku różnie wyznakowanych sond. Ocenia się, że lokalizacja sekwencji DNA z zastosowaniem sond niezotopowych jest 20-krotnie dokładniejsza niż metody tradycyjne [53]. Obecnie zastosowanie wysokiej klasy mikroskopów i czułych kamer CCD oraz efektywnych programów analizujących pozwoliło na dalsze udoskonalenie fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ*. Technika ta posiada 3 cechy decydujące o jej użyteczności [47]:

(i) wysoka czułość (1–5 kb), definiowana jako najkrótszy odcinek DNA możliwy do detekcji;

(ii) wysoka rozdzielczość (komórki metafazowe 1–3 Mb, komórki interfazowe 50 kb, DNA halos 1 kb) definiowana jako najmniejsza odległość w tysiącach par zasad pomiędzy dwoma zidentyfikowanymi odcinkami DNA, które mogą być zaobserwowane pod mikroskopem;

(iii) możliwość równoczesnej identyfikacji wielu różnych sond (do 12).

FISH wydaje się być szczególnie użyteczna w prognozowaniu i diagnozowaniu chorób nowotworowych [14, 19, 51]. Najprostsza metodą w określaniu niestabilności genetycznej w komórkach nowotworowych jest identyfikacja niewłaściwej liczby chromosomów. Typowa analiza cytogenetyczna mająca na celu wykrycie tego typu defektów opiera się na analizie kariotypu, a więc wymaga występowania komórek w metafazie. Ponieważ otrzymanie odpowiedniej liczby komórek w tej fazie wymaga prowadzenia hodowli *in vitro*, użyteczność tego postępowania w przypadku diagnozowania nowotworów jest praktycznie niewielka. Zastosowanie FISH umożliwia natomiast przeprowadzenie tego typu analiz przy użyciu komórek będących w interfazie [14].

Przykładem nowotworów, o których wiadomo, że charakteryzują się występowaniem trisomii chromosomu 8, są białaczki szpikowe. Dysponując sondami hybrydyzacyjnymi z powtarzalnymi sekwencjami DNA położonymi w okolicy centromeru możemy określić liczbę kopii tego chromosomu nawet w komórkach interfazowych. Ponieważ obszar centromerowy chromosomu pozostaje skondensowany przez cały cykl komórkowy, dlatego sygnał hybrydyzacyjny jest widoczny jako wyraźne punkty w obrębie jądra interfazowego. Podobne wyniki można otrzymać w przypadku niektórych białaczek limfatycznych (trisomia 12), raka jajnika (zmieniona liczba kopii chromosomu 12), raka pęcherza (zmieniona liczba kopii chromosomu 17) [14, 50]. Badania takie pozwalają również na prognozowanie przeżywalności np. w przypadku trisomii chromosomu 7 w raku prostaty [14].

Ponieważ przyjmuje się obecnie, że mniej niż 3% zachorowań o podłożu genetycznym jest spowodowanych zmianą dotyczącą jednego genu, konieczne wydaje się być stosowanie metod pozwalających na jednoczesne badanie zmian w kilku różnych sekwencjach DNA. Najprostszym sposobem obserwowania kilku różnych

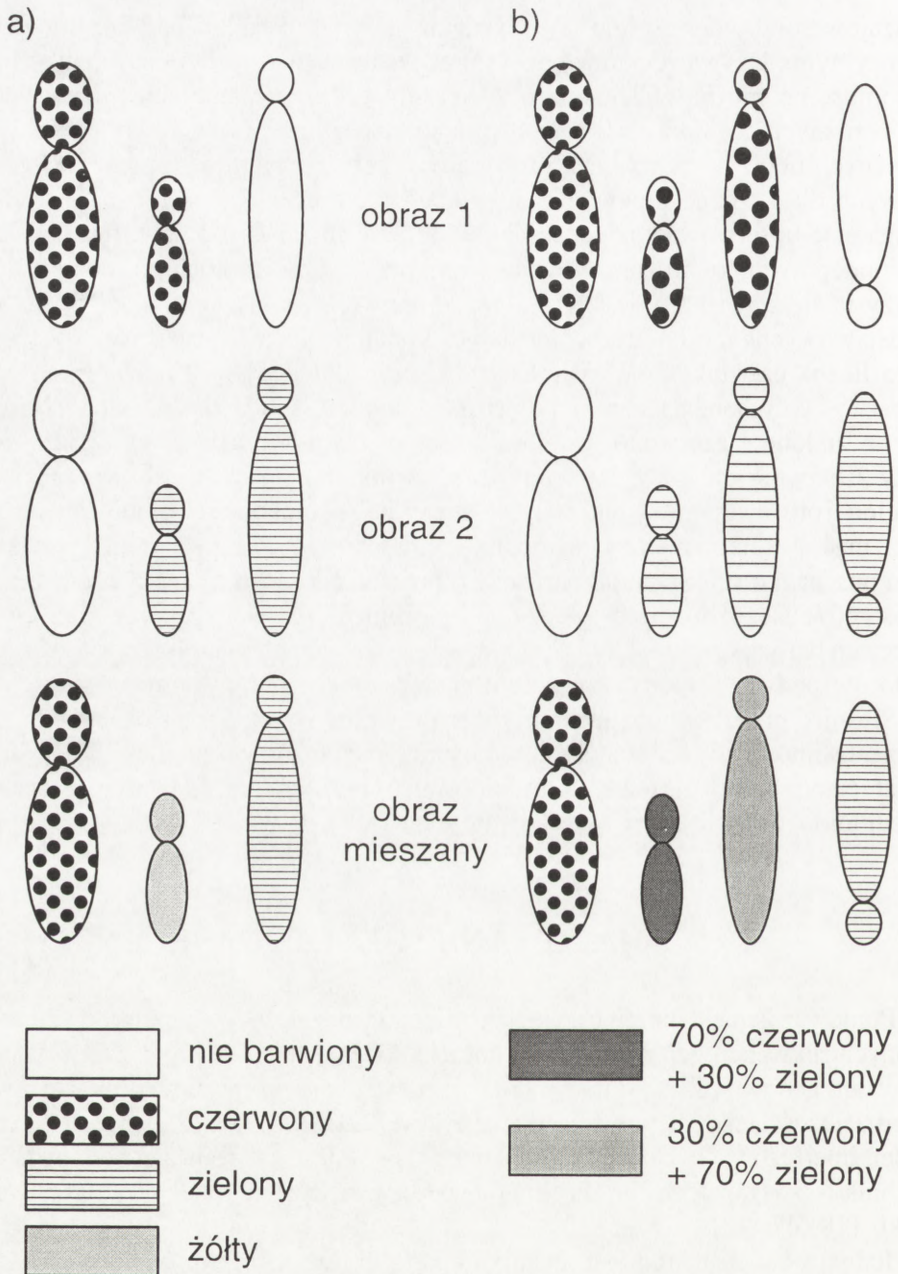
rodzajów sond jednocześnie jest wyznakowanie ich różnymi barwnikami fluorescencyjnymi. Używając odmiennie wyznakowanych sond specyficznych dla danego chromosomu można obecnie w obrębie jednego preparatu odmiennie wybarwić do 6 różnych chromosomów. Konstruując następnie obraz złożony z kilku niezależnych obrazów cyfrowych, otrzymanych przy różnych zestawach filtrów właściwych dla każdego z użytych barwników fluorescencyjnych, można na jednym preparacie obserwować jednocześnie kilka różnych chromosomów. Dla uzyskania podobnego wyniku wystarczy użycie mniejszej liczby fluorochromów, jeżeli wykorzystamy się zjawisko powstawania nowej barwy w wyniku mieszania się kolorów podstawowych (rys. 1). Liczbę możliwych kombinacji określa zależność $2^n - 1$, gdzie n to liczba barwników. W najprostszym przypadku, gdy $n=2$ możemy otrzymać 3 barwy. Gdy sonda I barwiona jest na czerwono, sonda II na zielono, a sonda III na zielono i czerwono, w efekcie otrzymamy w obrazie złożonym 3 kolory przy 2 barwnikach, gdyż dla sondy III w wyniku nakładania się barwy czerwonej i zielonej obserwujemy sygnał żółty. Jeszcze większą możliwość kombinacji możemy otrzymać stosując zmienione proporcje barwników dla różnych sond (rys. 1). W tym przypadku stosowanie 2 barwników pozwala na identyfikację 4 różnych chromosomów. Rozróżnienie pomiędzy chromosomami barwionymi przy różnych proporcjach barwników umożliwi komputerowe określenie zawartości poszczególnych kolorów podstawowych w sygnale z analizowanego chromosomu [14].

Stosując przedstawione techniki można również określać translokację odcinków chromosomów, gdy na jednym chromosomie metafazowym pojawia się sygnał od sond specyficznych dla różnych chromosomów [14, 25, 47, 48, 51] oraz równocześnie aneuploidii i amplifikacji określonego genu [50].

IV. MAPOWANIE GENETYCZNE

Ponieważ istnieje możliwość jednoczesnego i niezależnego umiejscowienia określonych sekwencji genetycznych za pomocą FISH, istnieje również możliwość mapowania genów [18, 20, 45, 46]. O ile w przypadku chromosomów metafazowych rozdzielczość tego mapowania nie jest zbyt duża i wynosi 2–3 Mb, to już dla jąder interfazowych zbliża się do 50 kb. Natomiast zastosowanie odpowiednich technik rozciągających chromatynę powoduje zwiększenie rozdzielczości nawet do 1 kb [18, 47, 48].

Jedną z takich metod jest technika oparta na rozciągnięciu włókien DNA izolowanych z komórek osadzonych w bloczkach agarowych [18]. Komórki zatopione w bloczku agarowym i poddane działaniu proteiny K i RNAazy A są umieszczane na szkle pokrytym poli-L-lizyną. Agar jest następnie roztopiany termicznie, a DNA jest rozciągane przy użyciu drugiego szkiełka i suszone. Na tak otrzymanych włók-



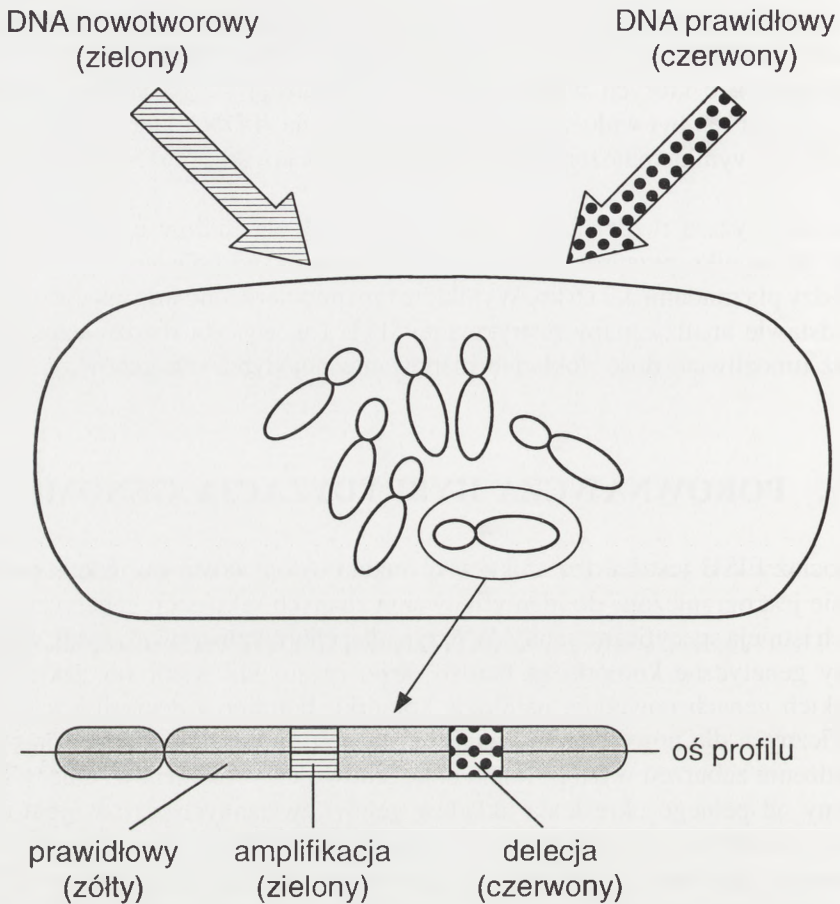
Rys. 1. Schemat barwienia różnicowego chromosomów za pomocą sond molekularnych znakowanych różnymi fluorochromami; znakowanie trzech (A) i czterech (B) typów chromosomów przy użyciu dwóch barwników fluorescencyjnych (wg [14] zmodyfikowane)

nach DNA Heiskanen i wsp. [18] mapowali położenie dwóch klonów cosmidów dla onkogenu *erbB-2* (CRC Neu1 – znakowany na zielono i CRC Neu4 – znakowany na czerwono), o których wiadomo było, że nakładają się na siebie na obszarze 25 kb. Obszar ten był widoczny na badanych włóknach DNA jako obszar świecący na żółto w wyniku nałożenia się sygnału zielonego od Neu1 i czerwonego od Neu4.

Jeszcze wyższą rozdzielczość otrzymano dla 3 plazmidów o wielkości 4,2, 6 i 7 kb. W wyniku przeprowadzonej analizy zmapowano położenie plazmidu 7 kb pomiędzy plazmidami 4,2 i 6 kb. Wynikiem tym potwierdzono informacje otrzymane na podstawie analizy mapy restrykcyjnej [18]. Tak wysoka rozdzielczość wydaje się już umożliwiać dość dokładne mapowanie pojedynczych genów.

V. PORÓWNAWCZA HYBRYDYZACJA GENOMÓW

Chociaż FISH jest bardzo efektywną metodą cytogenetyczną, jednak jej zastosowanie jest ograniczone do identyfikowania znanych sekwencji genetycznych, dla których istnieją specyficzne sondy. W przypadku chorób nowotworowych, w których zmiany genetyczne komórki są bardzo duże, często nie wiadomo, jakie zmiany i w jakich genach powodują patologię komórki. Pomimo zidentyfikowania wielu specyficznych dla nowotworów zmian w liczbie i organizacji chromosomów oraz stwierdzenia zaburzeń występowania onkogenów i antyonkogenów, dalecy jeszcze jesteśmy od pełnego określenia układów genów związanych z rozwojem danego rodzaju nowotworu. Powoduje to konieczność poszukiwania metod prostego i jednoczesnego obrazowania wielu różnic genetycznych (takich jak delecje czy amplifikacje genów) między komórkami prawidłowymi i nowotworowymi. Tego typu analiza stała się możliwa dzięki opracowaniu metod ilościowej analizy porównawczej hybrydyzacji genomów (ang. *comparative genomic hybridization* – CGH) [23, 35, 50]. W doświadczeniach tego typu izoluje się całkowite DNA z komórek prawidłowych i nowotworowych. Każda z tak otrzymanych próbek jest znakowana odmiennym fluorochromem. Odmiennie niż w przypadku FISH nie mamy tutaj do czynienia ze ściśle określoną sondą, lecz rolę sond odgrywa całkowity DNA komórek prawidłowych i nowotworowych. Następnie wyznakowane próbki miesza się ze sobą w stosunku 1:1 i hybryduje z prawidłowymi chromosomami metafazowymi (rys. 2). Jeśli wyznakujemy DNA komórek prawidłowych na czerwono, a nowotworowych na zielono, a dane sekwencje występują w takiej samej ilości w komórkach prawidłowych i nowotworowych, tzn. dany region nie uległ amplifikacji ani delecji, to wynikiem hybrydyzacji z prawidłowymi chromosomami będzie barwa żółta, powstała w skutek nakładania się sygnału pochodzącego od fragmentów wyznakowanych na zielono i czerwono. Dzieje się tak dlatego, że oba rodzaje sond



Rys. 2. Schemat metody porównawczej hybrydyzacji genomów (CGH), opis w tekście

mają takie samo prawdopodobieństwo hybrydyzacji z chromosomami metafazowymi. Jeśli jednak w DNA komórek nowotworowych nastąpiła delecja jakiegoś fragmentu genomu, nie wystąpi zabarwienie danego miejsca na kolor zielony, lecz jedynie czerwony pochodzący od DNA komórek prawidłowych. Przeciwnie, jeśli dany fragment genomu komórki nowotworowej uległ amplifikacji, to w zależności od jej stopnia w obserwowanym sygnale przeważał będzie kolor zielony. Analizę otrzymanego obrazu przeprowadza się wykorzystując komputerowy pomiar stosunku kolorów wzdłuż osi chromosomu. Na podstawie takiego profilu można sporządzić następnie mapę regionów wykazujących delecję względnie amplifikację. Możliwość taka jest niezwykle użyteczna w identyfikacji regionów DNA, w których zmiany są związane z powstawaniem nowotworów. Analiza tego typu pozwala na zaobserwowanie zwiększonej ilości kopii danego fragmentu DNA o 50%, tzn. jedną

dotatkową kopię w próbce diploidalnej dla fragmentów o wielkości co najmniej 2 Mb. Ale w przypadku amplifikacji rzędu 400% (tj. 8 dodatkowych kopii) można zaobserwować fragmenty o wielkości 250 kb lub nawet 100 kb dla amplifikacji 1000% (tj. 20 dodatkowych kopii). W przypadku analizy delekcji maksymalny stopień utraty liczby kopii DNA może oczywiście wynieść najwyżej 100% (tj. 2 kopie DNA) i jest zauważalny dla fragmentów o wielkości 1 Mb. Natomiast utrata 1 kopii DNA może być zaobserwowana dla fragmentów o wielkości co najmniej 2 Mb [35].

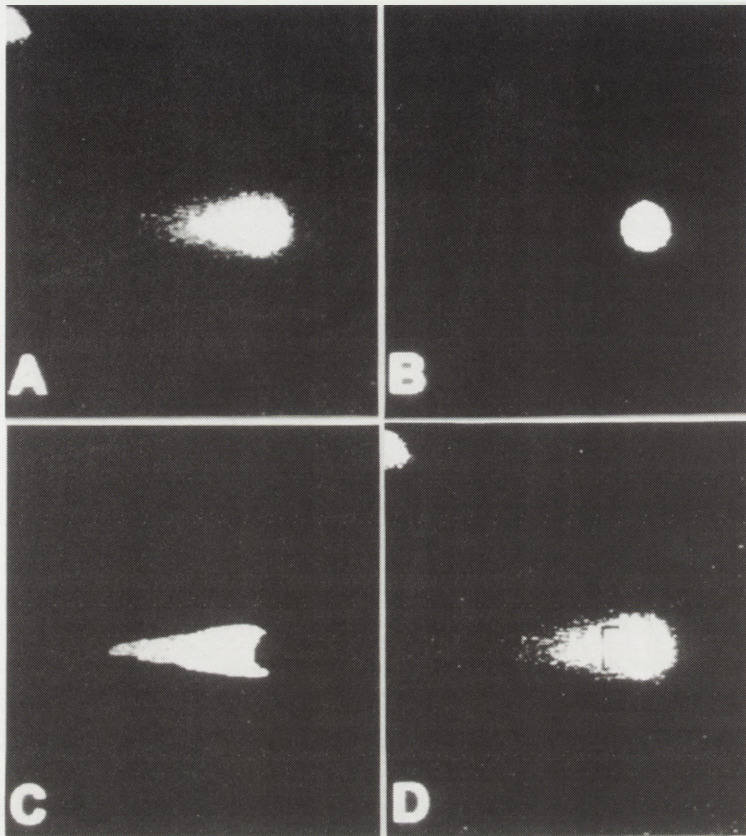
Podsumowując, do zalet metody CGH można zaliczyć:

- (i) brak konieczności posiadania specyficznych sond;
- (ii) brak konieczności posiadania dobrej jakości preparatów metafazowych badanych komórek nowotworowych;
- (iii) ze względu na specyfikę metody wykazującej jedynie duże różnice genetyczne, używany DNA komórek prawidłowych nie musi pochodzić od pacjenta, którego DNA jest poddawane analizie.

Te same cechy mogą być oczywiście uznane za wady tej metody. Prace nad dalszym jej udoskonaleniem ciągle trwają i prawdopodobnie już niedługo będzie istnieć możliwość w pełni automatycznej analizy CGH.

VI. ANALIZA USZKODZEŃ DNA W DRODZE ELEKTROFOREZY JĄDER POJEDYNCZYCH KOMÓREK

Kolejne zastosowanie cytometria obrazowa znalazła w pomiarach ilości DNA w jądrze komórkowym (przy użyciu barwników wiążących się ilościowo z DNA, np. bisbensimide Hoechst 33258, DAPI) lub syntezy DNA (przy użyciu bromodeoksyurydyny) [36, 37, 41, 42]. Obraz mikroskopowy tak wybarwionych jąder komórkowych przetwarza się na obraz cyfrowy, a następnie poddaje się segmentacji na tło i analizowane obiekty. Następnie wartości wszystkich pikseli w obrębie wyznaczonego jądra są sumowane. Otrzymana wartość liczbowa jest proporcjonalna do intensywności świecenia danego obszaru obrazu, a zatem określa ilość DNA w jądrze komórkowym [11, 33]. Metoda ta szczególnie często wykorzystywana jest w badaniach komórek nowotworowych, które bardzo często charakteryzują się anomaliami w podstawowej ilości DNA [8, 9, 21, 27, 29, 38, 40]. Praktycznie takie samo podejście metodyczne można zastosować przy analizie elektroforezy jąder pojedynczych komórek z wykorzystaniem tzw. metody kometkowej (ang. *Comet assay*). Szczegółowy opis tej metody wraz z możliwościami zastosowania można znaleźć w artykule przeglądowym P. Jałoszyńskiego i wsp. [22]. Metoda ta służy do detekcji ilości pęknięć DNA w pojedynczych komórkach. Zatopione w żelu komórki poddaje się lizie w różnych warunkach doświadczalnych, a następnie



Fot. 1. Zasada zastosowania komputerowych metod analizy obrazu do pomiaru zawartości DNA w poszczególnych częściach kometki; cyfrowy obraz kometki (A), wyodrębniona do analizy: "głowa kometki" (B), "ogon" (C) i fragment "ogona" (D)

przeprowadza się elektroforezę. Po wybarwieniu żelu odpowiednim barwnikiem fluorescencyjnym obserwujemy charakterystyczny obraz komety. Głowa komety odpowiada miejscu, gdzie przed lizą znajdowało się jądro komórki, natomiast ogon pojawia się, gdy DNA komórki uległo z jakichś przyczyn degradacji. Ponieważ stopień degradacji DNA jest proporcjonalny do wielkości ogona, to analiza otrzymanych wyników polega na analizie ilości DNA znajdującego się w głowie i ogonie komety. Najprostszy sposób analizy polega na liczeniu kometek podzielonych na określone kategorie morfologiczne uzależnione od długości ogona i wielkości głowy. Zastosowanie w tym przypadku komputerowej analizy obrazu znacznie zwiększa możliwość detekcji uszkodzeń DNA. Stosując takie same zasady pomiaru jak w przypadku analizy ilości DNA możemy w stosunkowo prosty sposób oznaczyć

procentową lub bezwzględną zawartość DNA w poszczególnych elementach komety (fot. 1). Tego typu analiza znacznie ułatwia interpretacje wyników oraz znacznie rozszerza stosowalność tej metody.

VII. ILOŚCIOWA ANALIZA ROZDZIAŁÓW ELEKTROFORETYCZNYCH BIAŁEK I KWASÓW NUKLEINOWYCH

Interesującą możliwością wykorzystania układu do analizy obrazu stanowi wykorzystanie go w praktycznie niezmiennym kształcie do ilościowej analizy żelów z rozdzielaniem elektroforetycznych. Zasada takich pomiarów jest zbliżona do wspomnianej wcześniej analizy ilości DNA w jądrach komórkowych. Zastępując w posiadanych układach do analizy obrazu mikroskop obiektywem możemy otrzymać obraz cyfrowy dowolnego żelu elektroforetycznego i dokonać prostej analizy porównawczej wykonując profil gęstości optycznej poszczególnych prążków. Jest to tzw. analiza 1-D. Teoretycznie dokładniejszą analizę można uzyskać stosując pomiar gęstości optycznej całego prążka, tj. sumując wartości wszystkich pikseli obszaru zdefiniowanego jako prążek (np. przez podanie wysokości progu oddzielającego tło od prążka) tak jak w przypadku analizy ilości DNA (tzw. analiza 2-D) [10, 34]. W praktyce, gdy mamy do czynienia z dość jednorodnymi prążkami, różnice wyników otrzymanych tymi dwoma metodami nie są istotne [10].

Najczęściej z uwagi na cenę i prostotę obsługi w układach do analizy żeli stosuje się jako sensory zwykłe kamery video. Ponieważ oferują one ze względu na wysokość wszelkiego rodzaju szumów stosunkowo mały zakres dynamiczny, to w przypadku porównywania prążków znacznie różniących się od siebie może dochodzić do przekłamań związanych ze spłaszczeniem obserwowanych różnic. Jest to jednak łatwe do zauważenia nawet na zwykłym profilu, gdy obserwujemy obcięte szczyty lub brak sygnału od słabszych prążków, które są widoczne na żelu. Pomimo tego zakres stosowalności tej metody analizy ilościowej prążków elektroforetycznych jest stosunkowo duży.

VIII. PODSUMOWANIE

Obserwowany w ostatnich latach gwałtowny rozwój metod komputerowej analizy obrazu spowodował próby ich zastosowania w genetyce molekularnej. Wykorzystanie tych metod do analizy wyników otrzymanych technikami fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* oraz porównawczej hybrydyzacji genomów może nie tylko dostarczyć wielu cennych informacji o genomie komórki, ale również może być użyteczną metodą stosowaną w prognozowaniu i diagnozowaniu wielu schorzeń mających podłoże genetyczne. Obecnie prowadzone są intensywne prace mające na celu pełną

automatyzację analizy obrazu będącą warunkiem powszechnego wprowadzenia metod komputerowej analizy obrazu do praktyki klinicznej.

LITERATURA

- [1] ATTLE JR, SWENSON R. Applications of image analysis. *International Laboratory* 1980; **10**: 35–48
- [2] AZIZ DC, BARATHUR RB. Quantitation and morphometric analysis of tumors by image analysis. *J Cell Biochem* 1994; **19**: 120–125.
- [3] BACUS JW, BACUS JV. Quality control in image cytometry: DNA ploidy. *J Cell Biochem Suppl* 1994; **19**: 153–164.
- [4] BALLARD SG, WARD DC. Fluorescence *in situ* hybridization using digital imaging microscopy. *J Histochem Cytochem* 1993; **41**: 1755–1759.
- [5] BALLOUK F, BOGUNIEWICZ A, ROSS JS, JENNINGS TA. Image analysis quantification in hormone receptor assay of mucinous carcinoma of the breast. Comparison with biochemical analysis. *Anal Quantitativ Cytol Histol* 1995; **17**: 151–156.
- [6] BENGTSOON E, NORDIN B, PEDERSEN F. MUSE- a new tool for interactive image analysis and segmentation based on multivariate statistics. *Comput Methods Programs Biomed* 1994; **42**: 181–200.
- [7] BERMAN JJ, MOORE GW. Image analysis software for the detection of preneoplastic and early neoplastic lesions. *Cancer Lett* 1994; **77**: 103–109.
- [8] BERTINO B, KNAPE WA, PYTLINSKA M, STRAUSS K, HAMMOU JC. A comparative study of DNA measured by flow cytometry and image analysis in 1864 specimens. *Anal Cell Pathol* 1994; **6**: 377–394.
- [9] BÜRGER RA, WIITSCH U, ENGEL H, POTRATZ D, STOCKLE M. Automated image analysis DNA cytometry in testicular cancer. *Urol Res* 1994; **22**: 17–20.
- [10] CHEHADEH HE, ZERLAUTH G, MANNHALTER JW. Video image analysis of quantitative competitive PCR products: Comparison of different evaluation methods. *Biotechniques* 1995; **18**: 26–28.
- [11] COHEN C. Image cytometric analysis in pathology. *Human Pathol* 1996; **27**: 482–493.
- [12] DAVENPORT RW, KATER SB. Local increases in intracellular calcium elicit local filopodial responses in helisoma neuronal growth cones. *Neuron* 1992; **9**: 405–416.
- [13] DESTEXHE E, BICKER E, COIGNOUL F. Image analysis evaluation of ploidy, S-phase fraction and nuclear area in canine mammary tumours. *J Comp Path* 1995; **113**: 205–216.
- [14] FOX JL, HSU P, LEGATOR MS, MORRISON LE, SEELIG SA. Fluorescence *in situ* hybridization: Powerful molecular tool for cancer prognosis. *Clin Chem* 1995; **41**: 1554–1559.
- [15] GUSTAFSON M, MAGNUSSON KE. A novel principle for quantitation of intracellular calcium changes using Fura-2 and a modified image processing system – applications in studies of neutrophil motility and phagocytosis. *Cell Calcium* 1992; **13**: 473–486.
- [16] HARMS H, GUNZER U, BAUMANN I, SERBOUTI S. Malignancy-associated changes in monocytes and lymphocytes in acute leukemias measured by high-resolution image processing. *Analyt Quant Cytol Histol* 1993; **15**: 371–378.
- [17] HEIDEN T, TRIBUKAIT B. New epi-fluorescence optical system for independent analysis of two different fluorochromes in microscopy. *Cytometry* 1995; **20**: 95–101.
- [18] HEISKANEN M, KARHU R, HELLSTEN E, PELTONEN L, KALIONIEMI OP, PALOTIE A. High resolution mapping using fluorescence *in situ* hybridization to extended DNA fibers prepared from agarose-embedded cells. *Biotechniques* 1994; **17**: 928–933.

- [19] HYYTINEN E, VISAKORPI T, KALLIONIEMI A, KALLIONIEMI OP, ISOLA JJ. Improved technique for analysis of formalin fixed, paraffin-embedded tumors by fluorescence *in situ* hybridization. *Cytometry* 1994; **16**: 93–99.
- [20] INAZAWA J, AZUMA T, ARIYAMA T, ABE T. A simple G-binding technique adaptable for fluorescent *in situ* hybridization (FISH) and physical ordering of human renin (REN) and cathepsin E (CTSE) genes by multi-color FISH. *Acta Histochem Cytochem* 1993; **26**: 319–324.
- [21] ITAKURA Y, SASANO H, MORI S, NAGURA H. DNA ploidy in human esophageal squamous dysplasias and squamous cell carcinomas as determined by image analysis. *Mod Pathol* 1994; **7**: 867–873.
- [22] JAŁOSZYŃSKI P, KUJAWSKI M, SZYFTER K. Elektroforeza pojedynczych komórek (*comet assay*) – użyteczna technika badania uszkodzeń DNA. *Post Biol Kom* 1996; **23**: 339–354.
- [23] KALLIONIEMI OP, KALLIONIEMI A, SUDAR D, RUTOVITZ D, GRAY JW, WALDMAN FM, PINKEL D. Comparative genomic hybridization for molecular analysis of solid tumors. *Science* 1992; **258**: 818–821.
- [24] KILLICH T, PLATH PJ, WEI X, BULTMANN H, RENSING L, VICKER MG. The locomotion, shape and pseudopodial dynamics of unstimulated *Dictyostelium* cells are not random. *J Cell Sci* 1993; **106**: 1005–1013.
- [25] KOBAYASHI H, MONGOMERY HT, BOHLANDER SK, ADRA CN, LIM BL, KUCHER-LAPATI RS, DONIS-KELLER H, HOLT MS, LE BEAU MM, ROWLEY JD. Fluorescence *in situ* hybridization mapping of translocations and deletions involving the short arm of human chromosome 12 in malignant hematologic diseases. *Blood* 1994; **84**: 3473–3482.
- [26] KOROHODA W. Badania migracji komórek – wrażliwości i trudności interpretacji. *Post Biol Kom* 1993; **20**: sup 2 3–17.
- [27] KOWAL-VERN A, SWINNEN LJ, SHANKEY V, WALLOCH J, POTOCKI D, GROSS FISHER S, MOLNAR Z. Flow and image cytometric DNA analysis of postcardiac transplant lymphomas. *Mod Pathol* 1994; **7**: 332–338.
- [28] KRYGIER-STOJAŁOWSKA A. Zasady cytofotometrii. [w] A Krygier-Stojałowska i H Godlewski [red]. Topochemiczne metody badań komórek i tkanek. PWN Warszawa 1982: 111–134.
- [29] LERMA E, LEE SJ, TUGUES D, OLIVA E, GICH I, PRAT J. Ploidy of 36 stromal tumors of the gastrointestinal tract. A comparative study with flow cytometry and image analysis. *Analyt Quant Cytol Histol* 1994; **16**: 435–440.
- [30] LOCKETT SJ, HERMAN B. Automatic detection of clustered, fluorescent-stained nuclei by digital image-based cytometry. *Cytometry* 1994; **17**: 1–12.
- [31] MACKIN RW, ROYSAM B, HOLMES TJ, TURNER JN. Automated three-dimensional image analysis of thick and overlapped clusters in cytologic preparations. Application to cytologic smears. *Analyt Quant Cytol Histol* 1993; **6**: 405–417.
- [32] MADDOX J. Towards more measurement in biology. *Nature* 1994; **368**: 95.
- [33] MADEJA Z, KOROHODA W. Niektóre zastosowania metod komputerowej analizy obrazu (cytometrii obrazowej) w biologii komórki. *Post Biol Kom* 1996; **23**: 457–476.
- [34] MINAMIKAWA-TACHINO R, ISHII K, SAKURABA H, SUZUKI Y, KAMINUMA T. Quantitative analysis of dystrophin gene amplification products using a PC-based image analysis system. *Int J Biomed Comput* 1993; **33**: 277–286.
- [35] PIPER J, RUTOVITZ D, SUDAR D, KALLIONIEMI A, KALLIONIEMI OP, WALDMAN FM, GRAY JW, PINKEL D. Computer image analysis of comparative genomic hybridization. *Cytometry* 1995; **19**: 10–26.
- [36] POULIN N, HARRISON A, PALCIC B. Quantitative precision of an automated image cytometric system for the measurement of DNA content and distribution in cells labeled with fluorescent nucleic acid stains. *Cytometry* 1994; **16**: 227–235.

- [37] POULIN NM, MATTHEWS JB, SKOV KA, PALCIC B. Effects of fixation method on image cytometric measurement of DNA content and distribution in cells stained for fluorescence with propidium iodide. *J Histochem Cytochem* 1994; **42**: 1149–1156.
- [38] ROSEN AC, GRAF AH, KLEIN M, LAHOUSEN M, VAVRA N, REINER A, HACKER GW. DNA ploidy in primary fallopian-tube carcinoma using image cytometry. *Int J Cancer* 1994; **58**: 362–365.
- [39] ROSTAGNO P, BIRTSWILE I, ETTORE F, COURDI A, GIOANNI J, NAMER M, CALDANIC. Immunohistochemical determination of nuclear antigens by colour image analysis: application for labelling index, estrogen and progesterone receptor status in breast cancer. *Anal Cell Pathol* 1994; **7**: 275–287.
- [40] RUBIN EM, DeROSE PB, COHEN C. Comparative image cytometric DNA ploidy of liver cell dysplasia and hepatocellular carcinoma. *Mod Pathol* 1994; **7**: 677–680.
- [41] SANTISTEBAN MS, MONTMASSON MP, GIROUD F, RONOT X, BRUGAL G. Fluorescence image cytometry of DNA content versus chromatin pattern: a comparative study of ten fluorochromes. *J Histochem Cytochem* 1992; **40**: 1789–1797.
- [42] SCHNELL SA, WESSENDORF MW. Bisbenzimidide: a fluorescent counterstain for tissue autoradiography. *Histochemistry* 1995; **103**: 111–114.
- [43] STEFANO GB. Computer-assisted microscopic image analysis in neuroimmunology. *Methods in Neuroscience*, Acad. Press, Inc., 1995 Vol. **24**: 210–219.
- [44] STERNBERG SJ. Imaging consideration for comparative genomic hybridization (CGH). *J NIH Res* 1994; **5**: 88.
- [45] STOKKE T, COLLINS C, KUO WL, KOWBEL D, SHADRAVAN F, TANNER M, KALLIONIEMI A, KALLIONIEMI OP, PINKEL D, DEAVEN L, GRAY JW. A physical map of chromosome 20 established using fluorescence *in situ* hybridization and digital image analysis. *Genomics* 1995; **26**: 134–137.
- [46] SZPIRER J, PEDEUTOUR F, KESTI T, RIVIERE M, SYVAOJA JE, TURC-CAREL C, SZPIRER C. Localization of the gene for DNA polymerase (POLE) to human chromosome 12q24.3 and rat chromosome 12 by somatic cell hybrid panels and fluorescence *in situ* hybridization. *Genomics* 1994; **20**: 223–226.
- [47] TANKE HJ, FLORIJN RJ, WIEGANT J, RAAP AK, VROLJIK J. CCD microscopy and image analysis of cells and chromosomes stained by fluorescence *in situ* hybridization. *Histochem J* 1995; **27**: 4–14.
- [48] TRASK BJ, ALLEN S, MASSA H, FERTITTA A, SACHS R, VAN DEN ENGH G, WU M. Studies of metaphase and interphase chromosomes using fluorescence *in situ* hybridization. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 1993; **LVIII**: 767–775.
- [49] VROLIJK J, SLOOS WCR, VERWOERD NP, TANKE HJ. Applicability of a noncooled video-rated CCD camera for detection of fluorescence *in situ* hybridization signals. *Cytometry* 1994; **15**: 2–11.
- [50] WALDMAN FM, SAUTER G, SUDAR D, THOMPSON CT. Molecular cytometry of cancer. *Human Pathol* 1996; **27**: 441–449.
- [51] WOLMAN SR. Fluorescence *in situ* hybridization: New tool for the pathologist. *Human Pathol* 1994; **25**: 586–590.
- [52] ZABEL M. Hybrydocytochemia w badaniach nad regulacją genu kalcytoninowego w komórkach parafolikularnych tarczycy. *Post Biol Kom* 1991; **18**: 47–53.
- [53] ZAWADA M, LATOS-BIELENSKA A. Hybrydyzacja *in situ* (ISH) w genetyce. *Post Biol Kom* 1993; **20**: 363–371.

Otrzymano: –

Przyjęto 24.06. 1997 r.

Adres autora: Al. A. Mickiewicza 3, 31-120, Kraków

WPLYW CZYNNIKÓW MECHANICZNYCH NA AKTYWNOŚĆ PROLIFERACYJNĄ I EKSPRESJĘ GENÓW W KOMÓRKACH ZWIERZĘCYCH*

THE EFFECT OF MECHANICAL FACTORS ON MITOTIC
ACTIVITY AND GENE EXPRESSION IN ANIMAL CELLS

Anna JURKIEWICZ, Jarosław CZYŻ

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

Streszczenie: Zdolność do rejestrowania i przetwarzania bodźców mechanicznych oraz ich zamiany na sygnał chemiczny wykazywana jest przez większość typów komórek zwierzęcych. Reakcje komórek na mechaniczne pobudzenie obejmować mogą zarówno zwiększoną aktywność proliferacyjną, jak i zmiany ekspresji genów w komórkach. Leżą one u podstaw zmian adaptacyjnych tkanki w odpowiedzi na wzrost jej obciążenia mechanicznego obserwowanych m.in. w mięśniu sercowym, tkance naczyniowej i kostnej. W pracy przedstawiono w zarysie aktualny stan wiedzy na temat mechanizmów percepcji bodźców mechanicznych przez komórki zwierzęce oraz ich zamiany na sygnały chemiczne. Omówiony został również wpływ czynników mechanicznych na aktywność proliferacyjną i ekspresje genów w komórkach oraz *remodelling* tkanki mięśnia sercowego

Słowa kluczowe: mechanodetekcja, błona komórkowa, kanały jonowe, cytoszkielet, transdukcja sygnału, ekspresja genów, proliferacja

Summary: The majority of normal animal cell types is capable of detecting mechanical stimuli and translating these stimuli into chemical signals. Cells respond to applied mechanical load by a variety of reactions, including increased mitotic activity and changes in gene expression. These reactions form the base for the adaptive response of the whole tissue, as observed among others in heart muscle, vascular and bone tissue. In this review we outlined the contemporary knowledge concerning the detection of mechanical stimuli by animal cells and thereby activated signal transduction pathways. We also discussed the effect of mechanical factors on cell mitotic activity and gene expression, and the remodelling of the mechanically overloaded heart muscle.

*Praca finansowana z grantu KBN nr 4P05A 014 12.

Key words: mechanodetection, cell membrane, ion channels, cytoskeleton, signal transduction, gene expression, proliferation

1. WSTĘP

Zdolność komórek do reagowania na bodźce zewnętrzne jest powszechnym zjawiskiem biologicznym. Komórki w organizmie wielokomórkowym komunikują się ze środowiskiem za pośrednictwem receptorów błonowych, które uaktywniają kaskady wtórnych przekaźników prowadzące do reakcji całych komórek. Receptory te można podzielić na wrażliwe na czynniki chemiczne (np. receptory czynników wzrostowych i hormonów) oraz wrażliwe na czynniki mechaniczne (np. mechanowrażliwe kanały jonowe). Większość typów komórek jest w stanie zarejestrować bodziec mechaniczny i przetworzyć go na sygnał biochemiczny. Mechanizmy detekcji bodźców mechanicznych są podobne u różnych typów komórek, jednak odpowiedź zależy od fenotypu komórki, jej stanu funkcjonalnego i innych czynników. Sygnał mechaniczny wywołuje reakcje fizjologiczne komórek, takie jak: zmiany ekspresji genów, intensywności syntezy białek (np. białek strukturalnych, kolagenu, prostaglandyn itp.) i szybkości wzrostu.

Uważa się, że istnieją dwa typy czynników mechanicznych działających na komórki: powodujące rozciągnięcie błony komórkowej (ang. *strain*) oraz wywołane przepływem płynu nad komórkami (ang. *shear stress*). Postuluje się, że komórki posiadają odrębne systemy detekcyjne dla każdego z typów czynników mechanicznych. Sygnały mechaniczne typu *strain* odbierane są i przetwarzane za pomocą dwóch podstawowych systemów: związanego z mechanowrażliwymi kanałami jonowymi i związanego z cytoszkieletem, które w pewnych przypadkach mogą ze sobą współdziałać. Mechanizm działania sygnału mechanicznego typu *shear stress* na komórki pozostaje nie do końca poznany. Detekcja sygnału mechanicznego związanego z przepływem płynu nad komórkami zachodzić może przez zmiany właściwości fizycznych błony komórkowej rejestrowane przez cytoszkielet i białka błonowe. Obciążenie wywołane przepływem płynu wywołuje zmiany właściwości fizycznych błony, w tym jej płynności, co stwierdzono na podstawie zwiększonej przepuszczalności błony dla niektórych barwników fluorescencyjnych.

Zdolność komórek do odbierania bodźców mechanicznych i reagowania na te bodźce jest niezwykle ważnym zjawiskiem leżącym u podstaw reakcji adaptacyjnej tkanek na zmienione warunki. Przykładem takiej reakcji może być zwiększona mineralizacja kości lub hipertrofia mięśnia sercowego w odpowiedzi na wzrost obciążenia mechanicznego.

W pracy omówiono ogólne mechanizmy detekcji bodźców mechanicznych przez komórki, szlaki reakcji na te bodźce oraz bardziej szczegółowo przedstawiono reakcje wybranych typów komórek.

2. MECHANIZMY DETEKЦИИ SYGNAŁÓW MECHANICZNYCH PRZEZ KOMÓRKI

2.1 Mechanowrażliwe kanały jonowe i enzymy błonowe

Mechanizm przetwarzania sygnału mechanicznego na sygnał chemiczny nie został jak dotąd dokładnie poznany. W procesie tym odgrywają istotną rolę mechanowrażliwe kanały jonowe [26, 27, 33]. Ich obecność stwierdzono u ponad 30 typów komórek *Prokaryota*, roślin, grzybów i u wszystkich dotychczas badanych zwierząt [5, 33, 39, 42, 58, 84]. Otwieranie mechanowrażliwych kanałów jonowych może następować bezpośrednio w reakcji na zmiany naprężenia błony komórkowej lub pośrednio – przez cytoszkielet [3, 27]. Doświadczenia polegające na wbudowywaniu do liposomów sklonowanych białek bakteryjnych mechanowrażliwych kanałów jonowych i badaniu ich techniką *patch-clamp* [55] wykazały, że możliwa jest aktywacja kanałów jonowych pod wpływem bodźca mechanicznego w liposomach, które z zasady pozbawione są cytoszkieletu [26, 74]. Wynik ten wskazuje, że białka kanałów jonowych mogą bezpośrednio reagować na zmiany naprężenia błony komórkowej.

Niektórzy autorzy sugerują, że w detekcji czynnika mechanicznego przez mechanowrażliwe kanały jonowe mogą uczestniczyć białka cytoszkieletu. Białka te mogą przenosić sygnał mechaniczny zarejestrowany na przykład przez integryny na kanały jonowe [3, 79]. Jak dotąd nie poznano, które białka mogłyby być odpowiedzialne za interakcje między mechanowrażliwymi kanałami jonowymi a cytoszkieletem. Sugeruje się, że funkcję tę pełnią spektryny i dystrofiny [27]. W przenoszeniu bodźca mechanicznego z otoczenia komórki do mechanowrażliwych kanałów jonowych mogą uczestniczyć również białka kontaktów zogniskowanych (ang. *focal contacts*), które łączą substancję międzykomórkową z cytoszkieletem [3].

Wykazano, że aktywacja mechanowrażliwych kanałów jonowych prowadzi do bardzo szybkiego (zachodzącego w milisekundach) wzrostu stężenia wapnia wewnątrzkomórkowego z jego stężenia podstawowego (35–50 nM) do stężenia ponad 1000 nM [59]. Badania mechanizmu wpływu mechanicznej stymulacji komórek na ich zachowanie dowiodły, że wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia jonów wapnia, następujący w wyniku aktywacji mechanowrażliwych kanałów wapniowych zależy m. in. od cytoszkieletu aktynowego i fosfolipazy C. Monoalid – inhibitor fosfolipazy C oraz cytochalazyna B – czynnik blokujący polimeryzację aktyny

powodują zanik reakcji komórek endotelialnych na mechaniczną stymulację [15]. Na tej podstawie zasugerowano mechanizm wpływu mechanicznej stymulacji komórek na stężenie jonów wapnia w cytoplazmie. Deformacja komórek prowadzi do aktywacji mechanowrażliwych kanałów wapniowych. Etap ten zależny jest od architektury cytoszkieletu. Lokalny wzrost stężenia jonów wapnia wywołuje aktywację fosfolipazy C, która przez syntezę inozytolotrójfosforanu (IP₃) powoduje uwolnienie jonów wapnia z zasobów wewnątrzkomórkowych i wzrost ich stężenia w całej komórce [15, 61].

Kanały jonowe mogą być również otwierane w wyniku bezpośredniej aktywacji przez sygnał mechaniczny niektórych enzymów błonowych, np. fosfolipazy C [25, 39]. W tym przypadku elementem bezpośrednio rejestrującym bodziec mechaniczny byłyby enzymy błonowe. Sygnał mechaniczny powoduje deformację dwuwarstwy lipidowej i zmiany konformacyjne niereceptorowych kinaz tyrozynowych, regulowane przez białka G. W efekcie aktywowane są enzymy m. in. cyklaza adenylowa, kinaza A [19], a przede wszystkim fosfolipaza C [15, 39]. W procesie tym najprawdopodobniej również zaangażowany jest cytoszkielet. Stwierdzono, że cytochalazyna B rozbijająca filamenty aktynowe prowadzi do zahamowania ścieżki przekazywania sygnału opartej na fosfolipazie C, znosząc odpowiedź komórki na czynniki mechaniczne [15, 39]

2.2 Rola cytoszkieletu w detekcji sygnału mechanicznego przez komórki

W ostatnich latach ukazały się prace, w których sugeruje się, że cytoszkielet oprócz roli w procesach otwierania mechanowrażliwych kanałów jonowych może bezpośrednio generować sygnał chemiczny w odpowiedzi na bodziec mechaniczny. Wykazano, że kontakty zogniskowane mogą być reorganizowane pod wpływem zadziałania sygnału mechanicznego w przeciągu zaledwie kilku sekund lub minut [3]. Na szczególną uwagę zasługują integryny oraz kompleksy białkowe związane z kontaktami zogniskowanymi (ang. *focal contacts*), ze względu na ich usytuowanie w obrębie lub bezpośredniej bliskości błony komórkowej i ich rolę w oddziaływaniu komórki z otoczeniem [35, 39, 40, 51, 59, 81]. W ich skład wchodzi szereg białek związanych z cytoszkieletem: białek strukturalnych, takich jak: α -aktynina, winkulina, talina, paksylina, tenzyna, białka kapturkowe, aktyna, kortaktyna i ezryna [6, 30, 31, 51], oraz białek regulatorowych, takich jak: kinazy białkowe pp₁₂₅FAK (ang. *focal adhesion kinase*) [30], pp₆₀src, ILK (ang. *integrin linked kinase*) [28], kinazy C [67], białka G, antyportu Na⁺/H⁺ [24, 62]. Postuluje się, że białka te mogą uczestniczyć w transdukcji bodźców mechanicznych. Ich aktywność byłaby modulowana przez zmiany konformacyjne białek strukturalnych spowodowane deformacjami cytoszkieletu po zadziałaniu bodźca mechanicznego [3]. Należy również pamiętać, że białka cytoszkieletu oddziałują z białkami błonowymi, takimi jak: enzymy, kanały jonowe i białka transportowe. W kontaktach zogniskowanych i

włóknach naprężeniowych zlokalizowanych jest szereg białek uczestniczących w kaskadach wtórnych przekaźników [35, 40, 62, 70]. Co ciekawe, niektóre kaskady, np. związane z kinazą FAK, są aktywowane w wyniku aktywacji receptorów zarówno czynników wzrostowych, jak i integryn [62]. Kaskada wtórnych przekaźników, angażująca białka Grb, Sos, Ras, Raf i MAPK (ang. *mitogen activated protein kinase*), może być uaktywniana zarówno przez ufosforylowane białko FAK, jak i przez receptor epidermalnego czynnika wzrostowego (EGF, ang. *epidermal growth factor*) [70, 85]. Kaskady te mogą uczestniczyć w reakcji komórki na bodziec mechaniczny. Ich aktywacja zachodzić może w wyniku deformacji niektórych białek w kompleksach związanych z kontaktami zogniskowanymi. Pod wpływem bodźca mechanicznego następuje wzrost ufosforylowania kinazy pp₆₀src oraz jej translokacja do kontaktów zogniskowanych [3]. Tego typu reakcję stwierdzono m.in. w przeciążonych mechanicznie kardiomiocytach. Bodziec mechaniczny powodował przejściowy wzrost ilości pp₆₀src we frakcji związanej z cytoszkieletem po 4 godzinach [45]. W tych samych komórkach stwierdzono również aktywację innych kaskad pod wpływem bodźca mechanicznego. Mechaniczne rozciąganie kardiomiocytów wywoływało wzrost aktywności m.in. kinazy MAP, kinazy kinazy MAP, kinazy S6 oraz kinazy Raf-1 [85].

Na podstawie doświadczeń wykonanych na komórkach śródbłonna uważa się, że bodziec mechaniczny wykrywany przez integryny przekazywany jest następnie do wnętrza komórki za pośrednictwem filamentów aktynowych, mikrotubul i filamentów pośrednich [71, 76]. Integryny mogą pośredniczyć w przenoszeniu bodźca mechanicznego bezpośrednio do jądra komórkowego, wpływając w ten sposób na jego strukturę i funkcję [38]. Włókna cytoszkieletu łączą się ze strukturami cytoszkieletarnymi macierzy jądra komórki przez laminy jądrowe [10]. Na tej podstawie sugeruje się bezpośredni wpływ bodźca mechanicznego rejestrowanego przez integryny na jądro komórkowe. Pod wpływem czynnika mechanicznego następować może reorganizacja macierzy jądrowej, wpływająca na zmiany aktywności wiązania czynników transkrypcyjnych do DNA, a przez to na ekspresję genów [53, 63].

2.3 Mechanizmy detekcji przepływu płynu nad komórkami

Omówione powyżej systemy mechanodetekcyjne – związane z mechanowrażliwymi kanałami jonowymi oraz z układem integryn służą komórkom przede wszystkim do rejestracji bodźców mechanicznych typu *strain*, powodowanych przez rozciągnięcie komórek. Istnieją również inne systemy pozwalające na rejestrację obciążeń wywołanych przepływem płynu nad komórkami (*shear stress*). Tego typu systemy badano głównie na komórkach śródbłonna, które, z racji swej funkcji, poddawane są bodźcom związanym z przepływem krwi [13, 22].

Sugeruje się, że bodziec mechaniczny związany z przepływem płynu nad komórkami może być odbierany przez komórki za pośrednictwem zmian naprężenia

i płynności błony komórkowej [25]. Sygnał taki może być następnie przekazywany do innych rejonów komórki. W procesie tym najprawdopodobniej zaangażowany jest cytoszkielet, gdyż wykazano, iż przepływ płynu nad komórkami prowadzi do reorganizacji cytoszkieletu aktynowego [23, 68, 76, 77]. Stwierdzono również zmiany kształtu komórek w odpowiedzi na taki bodziec, co potwierdza udział cytoszkieletu w tych procesach. [13, 54, 68, 76, 77].

Zmiany właściwości fizycznych błony komórkowej, w tym jej płynności i naprężenia mogą być również rejestrowane przez mechanowrażliwe enzymy błonowe, takie jak fosfolipaza A₂ i C [15, 22, 39, 48]. W efekcie aktywacji fosfolipazy A₂ z fosfolipidów błonowych uwalniany jest kwas arachidonowy, przekształcany następnie w prostaglandynę I₂ [48]. Z kolei aktywacja fosfolipazy C prowadzi do wzrostu stężenia inozytolotrójfosforanu i Ca⁺⁺ oraz wzrostu aktywności kinazy C. Możliwe jest, że w reakcjach tych zaangażowane są białka G, aktywowane już w ciągu pierwszej sekundy od zadziałania czynnika mechanicznego [25]. W doświadczeniach z pobudzonymi przepływem płynu komórkami śródbłonna wykazano, że inaktywacja białek G przez toksynę krztuśca prowadziła do zahamowania reakcji komórek na bodziec mechaniczny [25].

3. WCZESNA ODPOWIEDŹ KOMÓRKI NA BODZIEC MECHANICZNY

Transdukcja sygnału mechanicznego przez błonę komórkową i jego zamiana na sygnał chemiczny powoduje aktywację kaskad wtórnych przekaźników angażujących m.in. jony wapnia [1, 3, 7, 15, 36, 37, 57, 59, 82], fosfolipazę C [15, 39], białka G [25], cyklazę adenylową i guanylową [39], kinazę białkową C [57]. Sygnał chemiczny generowany w komórce przez bodziec mechaniczny przekazywany jest do jądra komórki, co prowadzi do zmian ekspresji niektórych genów. Reakcją komórki, zachodzącą już w ciągu pierwszej godziny od zadziałania czynnika mechanicznego jest zwykle wzrost ekspresji genów wczesnej odpowiedzi (ang. *Immediate Early Genes, IEG*) – czyli genów kodujących czynniki transkrypcyjne (np. c-myc, c-jun, c-fos, c-egr) [3, 13, 19, 75, 85]. Kinetyka zmian ekspresji tych genów jest podobna do obserwowanej w komórkach pobudzanych czynnikami wzrostowymi, a poziom ich ekspresji zależy od wielkości obciążenia (stopnia rozciągnięcia komórek) [44]. W doświadczeniach wykonanych techniką *northern blot* na pobudzanych mechanicznie kardiomiocytach wykazano wzrost poziomu mRNA dla genów kodujących kilka czynników transkrypcyjnych, w tym składników kompleksu AP-1 (Fos i Jun). Ta podwyższona ekspresja genów wczesnej odpowiedzi była przejściowa. Wzrost ciśnienia krwi w komorach mięśnia sercowego kota powodował wzrost poziomu mRNA dla Fos i Egr-1 po 1 godzinie. Wysoki poziom

mRNA utrzymywał się przez 4 godziny, po czym osiągał poziom podstawowy po 24 godzinach [66]. Z kolei w pobudzanych przepływem płynu komórkach śródbłonna wzrost ekspresji genu *c-myc* obserwowano już po kilku minutach, a *c-fos* i *c-jun* w ciągu 2 godzin [75].

Ciekawych danych dostarczyła analiza sekwencyjna regionów promotorowych genów aktywowanych w komórce w odpowiedzi na bodziec mechaniczny. Elementy promotorów odpowiedzialne za reakcję na obciążenie mechaniczne zostały zlokalizowane niedaleko SRE (ang. *serum response element*). Szczegółowo zbadano element wrażliwy na obciążenie promotora genu *c-fos* w kardiomiocytach, transfekując komórki genem skonstruowanym przez fuzję promotora *c-fos* i acetylotransferazy chloramfenikolu (CAT) [84]. Analizą delecyjną regionu C flankującego wykazano, że za reakcję komórki na bodziec mechaniczny odpowiedzialna jest sekwencja położona między -227 oraz -404 parą zasad, zawierająca SRE. Indukcja *c-fos* przez rozciąganie komórek hamowana była przez inhibitory kinazy C, co sugeruje, że ekspresja *c-fos* jest indukowana przez aktywację tego białka. Kinaza ta aktywowana jest prawdopodobnie bezpośrednio przez diacyloglicerol, co wykazano stwierdzając podniesiony poziom inozytolotrójfosforanu bezpośrednio po rozciągnięciu komórek [84].

Podobne sekwencje DNA odpowiedzialne za reakcje komórek na bodziec mechaniczny znaleziono w promotorze genu łańcucha B płytkowego czynnika wzrostowego (PDGF, ang. *platelet-derived growth factor*) [64]. Sekwencję rdzenia – GAGACC wykryto również w promotorach innych genów, których ekspresja aktywowana jest przez czynniki mechaniczne m.in. transformującego czynnika wzrostowego (TGF- β , ang. *transforming growth factor*) i czynnika chemotaksji monocytów [13, 57].

Oprócz syntezy *de novo* istnieje również możliwość aktywacji i przemieszczania w cytoplazmie gotowych czynników transkrypcyjnych pod wpływem czynnika mechanicznego. Przykładem tego mechanizmu jest aktywacja białka nF-kB obserwowana w komórkach śródbłonna pod wpływem obciążenia wywołanego przepływem płynu [13, 47]. Aktywowane czynniki transkrypcyjne wiążą się do promotorów genów kodujących białka należące do późnej odpowiedzi komórki na zadziałanie czynnika mechanicznego. Do późnej odpowiedzi komórki na bodziec mechaniczny należy m.in. synteza białek substancji międzykomórkowej, takich jak: kolagen, fibronektyna czy lamininy. Możliwe jest również wydzielanie czynników wzrostowych działających następnie w drodze mechanizmu auto- lub parakrynnego na sąsiednie komórki. Bodźce mechaniczne mogą również pobudzić komórki do rozpoczęcia syntezy DNA i proliferacji. Reakcję taką zaobserwowano w przypadku większości typów badanych komórek.

4. WPŁYW CZYNNIKÓW MECHANICZNYCH NA FIZJOLOGIĘ KOMÓREK *IN VITRO*

4.1 Zmiany aktywności proliferacyjnej komórek pod wpływem bodźców mechanicznych

Późna reakcja komórek na bodziec mechaniczny obejmować może zarówno zwiększoną ekspresję i sekrecję niektórych białek, jak i wzrost aktywności mitotycznej badanych komórek. Wzrost intensywności syntezy DNA pod wpływem czynników mechanicznych obserwowano między innymi w przypadku fibroblastów [34], komórek mięśni gładkich [34, 80, 81], osteoblastów [16, 39, 60], komórek nabłonkowych [11] i śródbłonkowych [3].

Curtis i Seehar [12] jako pierwsi zaobserwowali, że cykliczne rozciąganie siatki nylonowej, na którym hodowane były fibroblasty zarodka kurczęcia powodowało znaczny wzrost ich aktywności mitotycznej. Bodźce mechaniczne o częstotliwości 0,25, 0,5 i 1 Hz powodowały około 2-krotny wzrost aktywności mitotycznej badanych komórek. Późniejsze badania wpływu czynników mechanicznych na aktywność proliferacyjną komórek różnych typów pozwalają założyć powszechność tego zjawiska. Najczęściej stosowaną strategią badania wpływu bodźców mechanicznych na fizjologię komórek w hodowli *in vitro* było rozciąganie deformowalnych (najczęściej silikonowych) podłoży z rosnącymi na nich komórkami, a następnie określanie zmian aktywności mitotycznej i ekspresji genów w komórkach [1, 41, 60, 69, 81, 82]. Przy zastosowaniu tej techniki zaobserwowano wzrost aktywności mitotycznej m.in. komórek nabłonkowych [11] i osteoblastów [60] pod wpływem bodźca mechanicznego. W przypadku osteoblastów wykazano, że reakcja komórek zależy od siły bodźca. 1% rozciągnięcie podłoża, na którym rosły komórki powodowało ich najsilniejszą reakcję. Jednak wzrost siły bodźca przy zachowaniu tej samej częstotliwości wpływał hamująco na reakcję komórek [60].

W przypadku niektórych typów komórek, np. mięśni gładkich, wykryto, że ich reakcja na bodziec mechaniczny ma charakter pośredni i związana jest z mechanizmem parakrynnym [81]. Bodziec mechaniczny działający na te komórki powoduje wzrost ekspresji i sekrecji płytkowego czynnika wzrostowego (PDGF) do otoczenia. Czynniki te następnie pobudzają wzrost komórek. Wniosek ten potwierdziły doświadczenia z użyciem przeciwciał przeciwko PDGF i receptorowi PDGF. Stwierdzono, że ich dodanie do pożywki powodowało prawie całkowity zanik reakcji badanych komórek na bodziec mechaniczny. Także czas reakcji komórek na bodziec mechaniczny wskazuje na pośredni, a nie bezpośredni mechanizm reakcji. Najwięcej komórek syntetyzujących DNA obserwowano dopiero po 36–48 godzinach od zadziałania bodźca, podczas gdy dodanie czynnika wzrostowego powodowało wystąpienie maksymalnej reakcji już po 12–18 godzinach. Wydłużony czas reakcji na bodziec mechaniczny w porównaniu z czasem reakcji na dodanie czynnika wzro-

stowego tłumaczy się tym, że komórka w odpowiedzi na bodziec wydziela czynnik, który następnie auto- lub parakrynnie wpływa na jej aktywność mitotyczną [81].

Innym przykładem zaangażowania mechanizmu para- i autokrynnego w regulacji odpowiedzi komórek na bodziec mechaniczny może być wydzielanie PDGF-AA przez stymulowane mechanicznie komórki mięśni gładkich [3, 78] oraz wydzielanie angiotensyny II przez kardiomiocyty [7, 8, 34]. Pobudzone mechanicznie fibroblasty wydzielają m. in. fibroblastyczny czynnik wzrostowy (aFGF, ang. *acidic fibroblast growth factor*) i cytokiny [34, 69], które powodują wzrost mięśniówki gładkiej naczyń [34]. Z kolei endotelina I produkowana przez komórki śródbłonka [41, 57] wykazuje silne działanie mitogenne na komórki mięśniówki gładkiej naczynia [29] (tab. 1).

Działanie czynników mechanicznych i czynników wzrostowych na niektóre typy komórek może się wzajemnie uzupełniać. W przypadku komórek ścięgna zaobserwowano, że reakcja tych komórek na bodziec mechaniczny polegająca na podjęciu syntezy DNA i ekspresji cyklin jest znacznie silniejsza w obecności płytkowego czynnika wzrostowego niż pod jego nieobecność [3]. Sugeruje to, że ścieżki transdukcji sygnału aktywowane przez bodźce mechaniczne i czynniki chemiczne mogą synergistycznie wpływać na reakcje komórek, takie jak: synteza DNA, proliferacja i ekspresja niektórych genów [9, 62]. Wykazano jednocześnie, że komórki hodowane w warunkach pozbawionych zewnętrznych naprężeń, np. na żelach kolagenowych, traciły zdolność odpowiedzi na PDGF [50]. Oderwanie żelu, na którym rosły komórki, od podłoża powodowało spadek poziomu autofosforylacji receptora PDGF pod wpływem wiązania z ligandem. Zjawisko to można tłumaczyć wpływem naprężenia błony na właściwości receptora lub synergistycznym działaniem zależnej od naprężenia błony kaskady wtórnych przekaźników, która powoduje wzrost fosforylacji receptora PDGF, wpływając w ten sposób na jego aktywność [50].

Dotychczas omówiony został wpływ zewnętrznego bodźca mechanicznego o charakterze pulsacyjnym na zachowanie komórek i ich fizjologię. Wykazano jednak, że również statyczne rozciągnięcie komórek wpływać może na ich aktywność mitotyczną [80]. Co ciekawe większość typów prawidłowych komórek zwierzęcych przejawia spontaniczną kurczliwość, która, przez wpływ na naprężenie błony komórkowej i cytoszkieletu, może aktywować sensory wrażliwe na bodziec mechaniczny [52].

Curtis i Seehar [12] zasugerowali, że niektóre zjawiska kontaktowe obserwowane w hodowlach prawidłowych komórek zwierzęcych *in vitro*, np. zależność wzrostu od przyczepienia lub kontaktowe zahamowanie wzrostu, mogą wynikać z roli wewnątrzkomórkowych naprężeń w regulacji zachowania komórek. Naprężenia te mogą być wywoływane przez czynniki zewnętrzne, jak i przez spontaniczną aktywność skurczową samej komórki.

Wpływ wewnątrzkomórkowych naprężeń na właściwości komórek, w tym ich aktywność mitotyczną, najlepiej obrazują wyniki doświadczeń opisane przez Mochitate i wsp. [56]. Zaobserwowali oni, że oderwanie żelu kolagenowego na którym

Tabela 1. Reakcje wybranych typów komórek na bodźce mechaniczne

Typ komórek	Rodzaj reakcji	Referencje
Śródbłonkowe	zmiana kształtu	[23, 57, 68]
	reorganizacja cytoszkieletu	
	wzrost aktywności mitotycznej	[3]
	wzrost ekspresji:	
	prostacykliny	[22]
	PGI ₂	[22, 41]
	endoteliny-1	[29, 57]
	fibronektyny	[77]
	lamininy	
	surfaktantu	[82]
TGF-β	[34]	
IGF I i II		
	spadek ekspresji kolagenu	[3]
Kardiomiocyty	wzrost ekspresji:	
	białek aparatu kurczliwego	[19, 84]
	β-MHC	
	MLC	
	β-TM	
	troponin	
α-aktyny		
aFGF, TGF-β, ANF	[34, 46, 66, 83]	
angiotensyny II (All)	[84]	
receptora (All)	[8, 84]	
Osteoblasty	wzrost aktywności mitotycznej	[16, 39, 60]
	wzrost ekspresji:	
	kolagenu	[16]
	fosfatazy alkalicznej	[39]
	osteopontyny	
	osteocalcyny	
	PGE ₂	
IGF I		
	odkładanie wapnia	
Fibroblasty	wzrost aktywności mitotycznej	[12]
	wzrost ekspresji	
	kolagenu	[14]
	elastyny	
	aFGF, cytokiny	[34, 69]
Komórki mięśni gładkich	wzrost aktywności mitotycznej	[34, 80, 81]
	wzrost ekspresji:	
	kolagenu,	[3, 81]
	proteoglikanów	
	PDGF	[81]

rosły komórki, od podłoża szklanego, prowadzi do skurczu izotonicznego komórek, zmian w organizacji cytoszkieletu aktynowego i zahamowania wzrostu komórek. Wyniki te zostały potwierdzone przez innych autorów [32, 65].

W podobny sposób komórki zachowywały się w hodowlach na nieadhezywnych podłożach. W tych warunkach następował spadek syntezy DNA i wzrost ekspresji markerów różnicowania [18, 72]. Ponadto zaobserwowano korelację między kurczliwością komórek a ich aktywnością mitotyczną [43, 52]. Może to sugerować, że zmiany naprężenia błony komórkowej i cytoszkieletu generowane przez aparat kurczliwy samej komórki również mogą wpływać na jej fizjologię [3].

4.2 Wpływ czynników mechanicznych na ekspresję genów przez komórki

Innym typem reakcji komórek na zwiększone obciążenie mechaniczne jest wzrost lub zahamowanie syntezy i sekrecji niektórych białek (tab. 1). Wydzielanie przez pobudzone mechanicznie komórki czynników wzrostowych, np. PDGF, uczestniczących następnie w auto- i parakrynej regulacji aktywności mitotycznej komórek wstępnie omówiono w poprzednim rozdziale. Szereg typów komórek reaguje na bodziec mechaniczny wzrostem syntezy i sekrecji białek substancji międzykomórkowej. Wzrost syntezy kolagenu zaobserwowano między innymi w osteoblastach [16], komórkach mięśni gładkich [3, 81] i fibroblastach [14]. Z kolei komórki śródbłonna zmniejszają syntezę kolagenu w odpowiedzi na rozciąganie [3]. Innym typem odpowiedzi na bodziec mechaniczny jest wzrost syntezy proteoglikanów. Reakcję taką zaobserwowano w przypadku komórek mięśni gładkich, ścięgna i chrząstki [3]. W przypadku fibroblastów stwierdzono również wzrost sekrecji elastyny [14].

Wpływ mechanicznego obciążenia na strukturę tkanki kostnej badano na komórkach osteoblastycznych. Stwierdzono, że komórki te zwiększają odkładanie wapnia oraz ekspresję zasadowej fosfatazy, osteopondyny i osteokalcyny [39]. Prowadzi to do wzrostu gęstości tkanki kostnej. Co ciekawe, spadek obciążenia mechanicznego tkanki kostnej powoduje zanik substancji międzykomórkowej, co sugeruje bardzo istotną rolę czynników mechanicznych w regulacji struktury tej tkanki [39].

Podobny efekt działania czynników mechanicznych zaobserwowano w przypadku komórek śródbłonna. Komórki te w odpowiedzi na bodziec mechaniczny podnoszą ekspresję m.in. kolagenu IV, fibronektyny i lamininy oraz endoteliny 1 [3, 23, 29, 34, 77], a komórki śródbłonna płuc wydzielają surfaktant [82]. Stwierdzono również wydzielanie innych niebiałkowych substancji aktywnych w odpowiedzi komórek śródbłonkowych na zadziaływanie bodźca mechanicznego. Przykładem może być wydzielanie tlenu azotu [34], prostaglandyn [1, 22, 41] i prostacykliny [22]. Związki te zaangażowane są w procesie *remodellingu* naczynia pod wpływem zwiększonego obciążenia mechanicznego (tab. 1).

5. WPŁYW PRZECIĄŻENIA HEMODYNAMICZNEGO NA HYPERTROFIĘ MIĘŚNIA SERCOWEGO

Dobrze poznanym przykładem działania czynników mechanicznych na fizjologię tkanki jest wpływ nadciśnienia tętniczego na hipertrofię mięśnia sercowego. Klinicznym objawem patologicznego obciążenia mięśnia sercowego jest wzrost jego masy. Zjawisko to stanowi jedną z najpoważniejszych komplikacji zaburzeń układu krążenia prowadzącą do jego dysfunkcji [17, 49]. Wzrost masy mięśnia sercowego spowodowany jest przede wszystkim hipertrofią komórek, choć postuluje się również możliwą rolę hiperplazji, czyli wzrostu liczby komórek [4, 73]. Przerost mięśnia sercowego prowadzi do jego niedotlenienia, co jest wynikiem zbyt małego rozrostu naczyń krwionośnych zaopatrujących mięsień i zwiększenia drogi dyfuzji tlenu z naczyń do komórek. W efekcie niedotlenienia powstają lokalne obszary martwice, naciekane następnie przez fibroblasty i wypełniane kolagenem [7, 19, 34].

Wykazano, że wzrost obciążenia mechanicznego serca powoduje reakcję adaptacyjną tkanki polegającą m.in. na zmianach ekspresji niektórych genów. Geny, których ekspresja się zmienia pod wpływem zwiększonego obciążenia mięśnia sercowego, można zaliczyć do dwóch podstawowych grup: geny wczesnej odpowiedzi (ang. *immediate early genes*), których ekspresja pobudzana jest bardzo szybko i przejściowo (por. rozdział 3) i genów późnej odpowiedzi (ang. *late response genes*), do których należą geny kodujące m.in. białka tworzące układ kurczliwy komórki mięśniowej [19, 84], a także niektóre białka regulatorowe, np. angiotensyna II, receptor angiotensyny II [7, 8], przedsiorkowy czynnik natriuretyczny (ANF) [46, 66], czynniki wzrostowe [34]. Regulacja selektywnej aktywacji ekspresji tych genów zachodzi zarówno na poziomie alternatywnego splicingu mRNA, jak i na poziomie transkrypcji. Pod wpływem wzrostu obciążenia mechanicznego następuje wzrost ekspresji genów kodujących β -ciężki łańcuch miozyny (MHC) [19, 84], przedsiorkowy lekki łańcuch miozyny (MLC) [84], α -aktynę, troponinę oraz β -tropomiozynę (TM). Zaobserwowano również znaczny wzrost ekspresji formy V3 miozyny (homodimer β) w porównaniu z formą VI- α [84].

Zwiększone obciążenie mechaniczne powodować może również spadek ekspresji niektórych genów. Przykładem tego może być ekspresja zależnej od Ca^{++} ATPazy retikulum sarkoplazmatycznego (SERCA). Poziom mRNA tego białka spadał stopniowo w miarę wzrostu obciążenia mechanicznego. Efekt działania obciążenia mechanicznego jest tu podobny do działania czynników wzrostowych [84].

Obok omówionej bezpośredniej reakcji komórek serca na obciążenie mechaniczne istnieje również układ pośredniej odpowiedzi, działającej na komórki przez mechanizm para- i autokryny [2, 7, 8, 34]. Wykazano, że jednym z podstawowych czynników zaangażowanych w pośrednią reakcję komórek mięśnia sercowego na bodziec mechaniczny jest angiotensyna II. Wzrost obciążenia mechanicznego kardiomiocytów w hodowli powoduje wzrost ekspresji i sekrecji tego białka oraz jego

receptora. Angiotensyna II silnie pobudza hipertrofię komórek serca [4, 7, 8]. Wpływa ona na wzrost ekspresji genu *c-fos*, jak również na ekspresję genów późnej odpowiedzi (α -aktyny szkieletowej, przedsiolkowego czynnika natriuretycznego (ANF), transformującego czynnika wzrostowego (TGF β), endoteliny I) oraz podnosi poziom syntezy białek mierzony intensywnością wbudowywania fenyloalaniny [84].

Zaangażowanie angiotensyny II w procesach hipertrofii mięśnia sercowego pod wpływem nadmiernego obciążenia hemodynamicznego potwierdziły doświadczenia z wykorzystaniem antagonisty receptora tego peptydu CV-11974 [84]. Czynniki ten powodował częściowe zahamowanie hipertroficznego reakcji kardiomiocytów na mechaniczne pobudzenie w tym wzroście ekspresji genu *c-fos*, aktywności kinazy MAP, syntezy białek i wbudowywania fenyloalaniny. Sugeruje się, że bodziec mechaniczny może wpływać na fizjologię kardiomiocytów w sposób zarówno bezpośredni, jak pośredni w drodze autokrynej. Następować to może przez zwiększoną syntezę i sekrecję angiotensyny II, która następnie autokrynie pobudza hipertrofię komórek [4, 84]. Nie można wykluczyć, że inne typy komórek obecnych w sercu również mogą reagować na mechaniczne pobudzenie wydzielaniem angiotensyny II, wywołując w ten sposób reakcję kardiomiocytów [4].

W reakcji hipertroficznego mięśnia sercowego w odpowiedzi na zwiększenie obciążenia mechanicznego uczestniczą, oprócz kardiomiocytów, również inne typy komórek, a w szczególności fibroblasty [2, 4, 7, 34]. Komórki te są odpowiedzialne m.in. za produkcję i utrzymywanie substancji międzykomórkowej. Wykazano, że w wyniku przeciążenia mięśnia sercowego dochodzi do wzrostu aktywności proliferacyjnej oraz syntezy i wydzielania przez te komórki kolagenu [7, 20]. Ten wzrost aktywności fibroblastów może mieć podłoże fizjologiczne i być odpowiedzią na powstawanie lokalnych ognisk martwicy w mięśniu, w których zabliźnianiu komórki fibroblastyczne biorą udział [7, 34]. Postuluje się również, że komórki te mogą bezpośrednio reagować na bodziec mechaniczny. Zobserwowano wzrost aktywności mitotycznej oraz ekspresji niektórych genów, np. kolagenu, w fibroblastach hodowanych na rozciąganych podłożach [14]. Podobna reakcja może mieć miejsce w przeciążonym mięśniu sercowym. Oprócz tego komórki fibroblastyczne reagować mogą w drodze parakrynej na czynniki chemiczne wydzielane pod wpływem mechanicznego pobudzenia przez inne komórki obecne w mięśniu sercowym (np. kardiomiocyty). Fibroblasty mięśnia sercowego mają receptory dla angiotensyny II, która wydzielana jest m.in. przez kardiomiocyty w hodowli poddane mechanicznemu rozciąganiu [2]. Dodanie angiotensyny II do hodowli fibroblastów mięśnia sercowego wywołuje reakcję komórek analogiczną do reakcji na bodziec mechaniczny, tzn. wzrost aktywności mitotycznej oraz ekspresji kolagenu, fibronektyny i osteopontyny [2, 7]. Ponadto w przeciążonym mięśniu sercowym stwierdzono wzrost ekspresji innych czynników wzrostowych m.in. transformującego czynnika wzrostowego (TGF β), fibroblastycznego czynnika wzrostowego (FGF) oraz insu-

linopodobnych czynników wzrostowych (IGF I i II), które również mogą wpływać na zachowanie fibroblastów, pobudzając ich wzrost i ekspresję genów [34].

Patologiczny wzrost obciążenia mechanicznego następujący na skutek nadciśnienia tętniczego prowadzi również do reakcji adaptatywnej komórek mięśnia sercowego polegającej na wzroście wydzielania do krwioobiegu peptydów wazoaktywnych – przede wszystkim czynników natriuretycznych (ANF i BNF). Czynniki te wpływają na gospodarkę wodną całego organizmu powodując m.in. spadek ciśnienia krwi, a przez to spadek obciążenia mięśnia sercowego [46, 83].

6. PODSUMOWANIE

Bodźce mechaniczne różnych typów zaangażowane są w bardzo wiele procesów biologicznych, związanych przede wszystkim z adaptacyjną odpowiedzią tkanek i narządów. Zmiany obciążenia mechanicznego komórek wpływają na fizjologię komórek przez aktywację szeregu kaskad wtórnych przekaźników prowadzących do zmian ekspresji genów w komórkach, powodujących zmiany właściwości całej tkanki. Skutki patologicznego wzrostu obciążenia mechanicznego komórek wchodzących w skład niektórych tkanek, np. mięśnia sercowego lub kości, czynią badania nad mechanizmami i skutkami działania czynników mechanicznych na komórki niezwykle aktualnymi z punktu widzenia medycyny i patofizjologii. Dlatego należy spodziewać się dalszej intensyfikacji badań w tej dziedzinie.

LITERATURA

- [1] ARORA PD, BIBBY KJ, McCULLOCH CAG. Slow oscillations of free intracellular calcium ion concentration in human fibroblasts responding to mechanical stretch. *J Cell Phys* 1994; **161**: 187–200.
- [2] ASHIZAWA N, GRAF K, DO YS, NUNOHIRO T, GIACHELLI CM, MEEHAN WP, TUAN TL, HSUEH WA. Osteopontin is produced by rat fibroblasts and mediates A(II)-induced DNA synthesis and collagen gel contraction. *J Clin Inv* 1996; **98**: 2218–2227.
- [3] BANES AJ, TSUZAKI M, YAMAMOTO J, FISCHER T, BRIGMAN B, BROWN T, MILLER L. Mechanoreception at the cellular level; the detection, interpretation, and diversity of responses to mechanical signals. *Biochem Cell Biol* 1995; **73**: 349–365.
- [4] BEINLICH CJ, RISSINGER CJ, MORGAN HE. Mechanisms of rapid growth in the neonatal pig heart. *J Mol Cell Cardiol* 1995; **27**: 273–281.
- [5] BETT GCL, SACHS F. Cardiac mechanosensitivity and stretch-activated ion channels. *Trends in Cardiovasc Med* 1997; **1**: 4–8.
- [6] BHATTACHARAYA S, FU CZ, BHATTACHARAYA J, GREENBERG S. Soluble ligands of the alpha(v)beta(3) integrin mediate enhanced tyrosine phosphorylation of multiple proteins in adherent bovine pulmonary artery endothelial cells. *J Biol Chem* 1995; **270**: 16781–16787.
- [7] BOOZ GW, BAKER KM. Molecular mechanisms controlling growth and function of cardiac fibroblasts. *Cardiovasc Res* 1995; **30** (4): 537–543.
- [8] BOOZ GW, BAKER KM. Role of type 1 and type 2 angiotensin receptors in angiotensin II-induced cardiomyocyte hypertrophy. *Hypertension* 1996; **28**: 635–640.

- [9] BORNFELDT KE, RAINES EW, GRAVES LM, SKINNER MP, KREBS EG, ROSS R. Platelet-derived growth factor. Distinct signal transduction pathways associated with migration versus proliferation. *Ann N Y Acad Sci* 1995; **766**: 416–430.
- [10] BOUDREAU N, MYERS C, BISSEL MJ. From laminin to lamin: regulation of tissue-specific gene expression by the ECM. *Trends Cell Bio* 1995; **5**: 1–4.
- [11] BRUNETTE DM. Mechanical stretching increases the number of epithelial cells synthesizing DNA in culture. *J Cell Sci* 1984; **69**: 35–45.
- [12] CURTIS ASG, SEEHAR GM. The control of cell division by tension or diffusion. *Nature* 1978; **274**: 52–53.
- [13] DAVIES PF, BARBEE KA. Endothelial cell surface imaging: insights into hemodynamic force transduction. *News in Phys Sci* 1994; **9**: 153–157.
- [14] DESROSIERS EA, METHOT S, YAHIA L, RIVARD CH. Responses of ligamentous fibroblasts to mechanical stimulation. *Ann Chir* 1995; **49(8)**: 768–774.
- [15] DIAMOND SL, SACHS F, SIGURDSON WJ. Mechanically induced calcium mobilisation in cultured endothelial cells is dependent on actin and phospholipase. *Arterioscler Thromb*. 1994; **14**: 2000–2006.
- [16] DUNCAN RL, TURNER CH. Mechanotransduction and the functional response of bone to mechanical strain. *Calcif Tissue Int* 1995; **57(5)**: 344–358.
- [17] DUNN FG. Cardiac hypertrophy and hypertension. *Blood Press Suppl* 1995; **2**: 17–21.
- [18] EMERMAN JT, PITELKA DR. Maintenance and induction of morphological differentiation in dissociated mammary epithelium on floating collagen membranes. *In Vitro (Rockville)* 1977; **13**: 316–328.
- [19] ERDOS T, BUTLER-BROWNE GS, RAPPAPORT L. Mechanogenetic regulation of transcription. *Biochimie* 1991; **73**: 1219–1231.
- [20] FARHADIAN F, CONTARD F, SABRI A, SAMUEL JL, RAPPAPORT L. Fibronectin and basement membrane in cardiovascular organogenesis and disease pathogenesis. *Cardiovasc Res* 1996; **32**: 433–442.
- [21] FEDERMAN M, NICHOLS G. Bone cell cilia, vestigial or functional organelles? *Calcif Tiss Res* 1974; **17**: 81–85.
- [22] FRANGOS JA, McINTIRE LV, ESKIN SG. Shear stress induced stimulation of mammalian cell metabolism. *Biotechn and Bioeng* 1988; **32**: 1053–1060.
- [23] GIRARD PR, NEREM RM. Shear stress modulates endothelial cell morphology and F-actin organization through the regulation of focal adhesion-associated proteins. *J Cell Phys* 1995; **163**: 179–193.
- [24] GRINSTEIN S, WOODSIDE M, WADDELL TK, DOWNEY GP, ORLIWSKI J, POUYS-SEGUR J, WONG DCP, FOSKETT JL. Focal localisation of the NHE-1 isoform of the Na^+/H^+ antiport: assessment of effects on intracellular pH. *EMBO J* 1993; **12**: 5209–5218.
- [25] GUDI SRP, CLARK CB, FRANGOS JA. Fluid flow rapidly activates G proteins in human endothelial cells. Involvement of G proteins in mechanical signal transduction. *Circ Res* 1996; **79**: 834–839.
- [26] HAMILL OP, McBRIDE D. Molecular clues to mechanosensitivity. *Biophys J* 1993; **65**: 17–18.
- [27] HAMILL OP, McBRIDE JW Jr. Mechanoreceptive membrane channels. *Am Sci* 1995; **83**: 30–37.
- [28] HANNIGAN GE, LEUNG-HAGESTEIJN C, FITZ-GIBBON L, COPPOLINO MG, RADEVA G, FILMUS J, BELL JC, DEDHAR S. Regulation of cell adhesion and anchorage-dependent growth by a new beta 1-integrin-linked protein kinase. *Nature* 1996; **379 (6560)**: 91–96.
- [29] HASDAI D, HOLMES D-R, GARRATT KN, EDWARDS WD, LERMAN A. Mechanical pressure and stretch release endothelin-1 from human atherosclerotic coronary arteries *in vivo*. *Circ* 1997; **95**: .

- [30] HILDEBRAND JD, SCHALLER MD, PARSONS JT. Identification of sequences required for the efficient localisation of the focal adhesion kinase, pp125FAK, to cellular focal adhesions. *J Cell Biol* 1993; **123**: 993–1005.
- [31] HILDEBRAND JD, SCHALLER MD, PARSONS JT. Paxillin, a tyrosine phosphorylated focal adhesion-associated protein binds to the carboxyl domain of focal adhesion kinase. *Mol Biol Cell* 1995; **6**(6): 637–647.
- [32] HOHN HP, STEIH U, DENKER HW. A novel artificial substrate for cell culture: effects of substrate flexibility/malleability on cell growth and morphology. *In Vitro Dev Biol* 1995; **31**: 37–44.
- [33] HU H, SACHS F. Mechanically activated currents in chick heart muscle. *J Membrane Bio* 1996; **154**: 205–216.
- [34] HUDLICKA O. Mechanical factors involved in the growth of the heart and its blood vessels. *Cell Mol Biol Res* 1994; **40**: 143–152.
- [35] HUMPHRIES MJ. Integrin activation: the link between ligand binding and signal transduction. *Cur Op Cell Bio* 1996; **8**: 632–640.
- [36] HUNG CT, ALLEN FD, POLLACK SR, BRIGHTON CT. What is the role of the convective current density in the real-time calcium response of cultured bone cells to fluid flow? *J Biomechanics* 1996; **29**: 1403–1409.
- [37] HUNG CT, ALLEN FD, POLLACK SR, BRIGHTON CT. Intracellular Ca^{2+} stores and extracellular Ca^{2+} are required in the real-time Ca^{2+} response of bone cells experiencing fluid flow. *J Biomechanics* 1996; **29**: 1411–1417.
- [38] INGBER DE. Cellular tensegrity: defining new rules of biological design that govern the cytoskeleton. *J Cell Sci* 1993; **104**: 613–627.
- [39] JONES D, LEIVSETH G, TENBOSCH J. Mechano-reception in osteoblast-like cells. *Biochem Cell Biol*. 1995; **73**: 525–534.
- [40] JULIANO RL, HASKILL S. Signal transduction from the extracellular matrix. *J Cell Biol* 1993; **120**: 577–585.
- [41] KANDA K, MATSUDA T. Behavior of arterial wall cells cultured on periodically stretched substrates. *Cell Transplantation* 1993; **2**: 475–484.
- [42] KIZER N, GUO X-L, HRUSKA K. Reconstitution of stretch-activated cation channels by expression of the α -subunit of the epithelial sodium channel cloned from osteoblasts. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; **94**: 1013–1018.
- [43] KOLODNEY MS, WYSOLMERSKI RB. Isometric contraction by fibroblasts and endothelial cells in tissue culture: a quantitative study. *J Cell Biol* 1992; **117**: 73–82.
- [44] KOLPAKOV V, REKHTER MD, GORDON D, WANG WH, KULIK TJ. Effect of mechanical forces on growth and matrix protein synthesis in the *in vitro* pulmonary artery. Analysis of the role of the individual cell types. *Circ Res* 1995; **77**(4): 823–831.
- [45] KUPPUSWAMY D, KERR C, NARISHIGE T, KASI VS, MENICK DR, COOPER IV G. Association of tyrosine-phosphorylated c-src with the cytoskeleton of hypertrophying myocardium. *J Biol Chem* 1997; **272** (7): 4500–4508.
- [46] LAINE M, ID L, VOULTEENAHO O, RUSKOAHO H, WECKSTROM M. Role of calcium in stretch-induced release and mRNA synthesis of natriuretic peptides in isolated rat atrium. *Eur J Phys* 1996; **432**: 953–960.
- [47] LAN Q, MERCURIUS KO, DAVIES PF. Stimulation of transcriptional factors NF-kB and AP-1 in endothelial cells subjected to shear stress. *Biophys Res Commun* 1994; **201**: 950–956.
- [48] LEHTONEN JYA, KINNUNEN PKJ. Phospholipase A(2) as a mechanosensor. *Biophys J* 1995; **68**: 1888–1894.
- [49] LI P, HOFMANN PA, LI B, MALHOTRA A, CHENG W, SONNENBLICK EH, MEGGS LG, ANVERSA P. Myocardial infarction alters myofilament calcium sensitivity and mechanical behavior of myocytes. *Am J Physiol* 1997; **272**: H360–H370.

- [50] LIN YC, GRINELL F. Decreased level of PDGF-stimulated receptor autophosphorylation by fibroblasts in mechanically relaxed collagen matrices. *J Cell Biol* 1993; **122**: 663–672.
- [51] LUNA EJ, HITT AL. Cytoskeleton – plasma membrane interactions. *Science* 1992; **258**: 955–964.
- [52] MACIEIRA-COELHO A, AZZARONE B. Correlation between contractility and proliferation in human fibroblasts. *J Cell Phys* 1990; **142**: 610–614.
- [53] MANIOTIS AJ, CHEN CS, INGBER DE. Demonstration of mechanical connections between integrins cytoskeletal filaments, and nucleoplasm that stabilise nuclear structure. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; **94**(3): 849–854.
- [54] MATYAS JR, ANTON MG, SHRIVES NG, FRANK CB. Stress governs tissue phenotype at the femoral insertion of the rabbit MCL. *J Biomechanics* 1995; **28**(2): 147–157.
- [55] McBRIDE DW Jr, HAMILL OP. Pressure-clamp technique for measurement of the relaxation kinetics of mechanosensitive channels. *Trends in Neurosciences* 1993; **16**(9): 341–345.
- [56] MOCHITATE K, PAWELEK P, GRINNELL F. Stress relaxation of contracted collagen gels: disruption of actin filament bundles, release of cell surface fibronectin and down-regulation of DNA and protein synthesis. *Exp Cell Res* 1991; **193**: 198–207.
- [57] MORITA T, KURIHARA H, MAEMURA K, YOSHIZUMI M, NAGAI R, YAZAKI Y. Role of Ca^{2+} and Protein Kinase C in shear stress-induced actin depolymerization and endothelin 1 gene expression. *Circ Res* 1994; **75**: 630–636.
- [58] NARUSE K, SOKABEM. Involvement of stretch-activated ion channels in Ca^{2+} mobilisation to mechanical stretch in endothelial cells. *Am J Phys* 1993; **264**: C1037–C1044.
- [59] NEBE B, RYCHLY J, KNOPP A, BOHN W. Mechanical induction of beta-1-integrin-mediated calcium signalling in a hepatocyte cell line. *Exp Cell Res* 1995; **218**(2): 479–484.
- [60] NEIDLINGER-WILKE C, WILKE HJ, CLAES L. Cyclic stretching of human osteoblasts affects proliferation and metabolism: a new experimental model and its application. *J Orthopaedic Res* 1994; **12**: 70–78.
- [61] PERACCHIA C. Effects of the anesthetics heptanol, halothane and isoflurane on gap junction conductance in crayfish separate axons: a calcium and hydrogen-independent phenomenon potentiated by caffeine and theophylline and inhibited by 4-aminopyridine. *J Membr Biol* 1991; **121**: 67–78.
- [62] PLOPPER GE, McNAMEE HP, DIKE LE, BOJANOWSKI K, INGBER DE. Convergence of integrin and growth factor receptor signalling pathways within the focal adhesion complex. *Mol Biol Cell* 1995; **6**(10): 1349–1365.
- [63] PUCK TT, KRYSOSEK A. Role of cytoskeleton in genome regulation and cancer. *Int Rev Cyt* 1992; **132**: 75–108.
- [64] RESNICK NT, COLLINS W, ATKINSON DT, BONTHRON CF, DEWEY CF, GIMBRONE MA. Platelet-derived growth factor B chain promoter contains a cis-acting fluid shear-stress response element. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; **90**: 4591–4595.
- [65] ROSKELLELY CD, BISSEL MJ. Dynamic reciprocity revisited: a continuous, bidirectional flow of information between cells and the extracellular matrix regulates mammary epithelial cell function. *Biochem Cell Biol* 1995; **73**: 391–397.
- [66] ROZICH JD, BARNES MA, SCHMID PG, ZILE MR, McDERMOTT PJ, COOPER G IV. Load effects on gene expression during cardiac hypertrophy. *J Mol Cardiol* 1995; **27**: 485–499.
- [67] RUOSLAHTI E, NOBLE NA, KAGAMI S, BORDER WA. Integrins. *Kidney Int* 1994; **45**: S17–S22.
- [68] SATO M, OHSHIMA N. Flow-induced changes in shape and cytoskeletal structure of vascular endothelial cells. *Biotechnology* 1994; **31**(2): 143–153.
- [69] SHIMIZU N, YAMAGUCHI M, GOSEKI T, OZAWA Y, SAITO K, TAKIGUCHI H, IWASAWA T, ABIKO Y. Cyclic-tension force stimulates interleukin-1 β production by human periodontal ligament cells. *J Periodont Res* 1994; **29**: 328–333.

- [70] SHLAEPFER DD, HANKS SK, HUNTER T, VAN DER GEER P. Integrin-mediated signal transduction linked to RAS pathway by Grb 2 binding to focal adhesion kinase. *Nature* 1994; **372**: 786–791.
- [71] SIMS JR, KARP S, INGBER DE. Altering the cellular mechanical force balance results in integrated changes in cell, cytoskeletal and nuclear shape. *J Cell Sci* 1992; **103**: 1215–1222.
- [72] SINGHVIR, KUMAR A, LOPEZ GP, STEPHANOPULOS GN, WANG DIC, WHITESIDES GM, INGBER DE. Engineering cell shape and function. *Science* 1994; **264**: 696–693.
- [73] SOONPAA MH, FIELD LJ. Assessment of cardiomyocyte DNA synthesis during hypertrophy in adult mice. *Am J Physiol* 1994; **35**: H1439–H1445.
- [74] SUKHAREV SI, MARTINAC B, ARSHAVSKY VY, KUNG C. Two types of mechanosensitive channels in the *E. coli* cell envelope: solubilization and functional reconstitution. *Biophys J* 1993; **65**: 177–183.
- [75] SUMPIO BE, DU W, XU W. Exposure of endothelial cells to cyclic strain induces c-fos, fosB and c-jun but not junB or junD and increases the transcription factor AP-1. *Endothelium* 1994; **22**: 149–156.
- [76] TAKEMASA T, SUGIMOTO K, YAMASHITA K. Amplitude-dependent stress fiber reorientation in early response to cyclic strain. *Exp Cell Res* 1997; **230(2)**: 407–410.
- [77] THOUMINE O, NEREM RM, GIRARD PR. Oscillatory shear stress and hydrostatic pressure modulate cell-matrix attachment proteins in cultures endothelial cells. *In Vitro Cell Dev Biol* 1995; **31A**: 45–54.
- [78] VIVES GJ, WILSON E, COLLINS T, SUKHATME V, IVES HE. Mechanical strain enhances expression of the PDGF-A and EGR-1 genes in VSM cells. *Pyysiologist* 1994; **37**: A-3.
- [79] WANG N, BUTLER JP, INGBER DE. Mechanotransduction across the cell surface and through the cytoskeleton. *Science* 1993; **260**: 1124–1127.
- [80] WEISER MCM, MAJACK RA, TUCKER A, ORTON EC. Static tension is associated with increased smooth muscle cell DNA synthesis in rat pulmonary arteries. *Am J Phys* 1995; **37**: H1133–H1138.
- [81] WILSON E, MAI Q, SUDHIR K, WEISS RH, IVES HE. Mechanical strain induces growth of vascular smooth muscle cells via autocrine action of PDGF. *J Cell Bio* 1993; **123**: 741–747.
- [82] WIRTZ HRW, DOBBS LG. Calcium mobilisation and exocytosis after one mechanical stretch of lung epithelial cells. *Science* 1990; **250**: 1266–1269.
- [83] XU T, JIAO JH, PENCE RA, BAERTSCHI. ATP-sensitive potassium channels regulate stimulated ANF secretion in isolated rat heart. *Am J Phys* 1996; **40(6)**: H2339–H2345.
- [84] YAMAZAKI T, KOMURO I, YAZAKI Y. Molecular mechanism of cardiac cellular hypertrophy by mechanical stress. *J Mol Cardiol* 1995; **27**: 133–140.
- [85] ZHU X, ASSOIAN RK. Integrin-dependent activation of MAP kinase: a link to shape-dependent cell proliferation. *Mol Bio Cell* 1995; **6**: 273–282.

Otrzymano: –

Przyjęto: 24.06. 1007 r.

Adres autora: 31-120 Kraków, Al. Mickiewicza 3

ZASTOSOWANIE CYTOMETRII PRZEPEŁYWOWEJ W BADANIU EKSPRESJI GENÓW

APPLICATION OF FLOW CYTOMETRY IN GENE EXPRESSION STUDY

Aleksandra DUDA

Zakład Mikrobiologii i Immunologii, Instytut Biologii Molekularnej, Uniwersytet
Jagielloński, Kraków

Streszczenie: Cytometria przepływowa jest metodą powszechnie wykorzystywaną w immunofenotypowaniu komórek oraz analizie białek, zarówno powierzchniowych jak i wewnątrzkomórkowych. Ostatnie lata przyniosły pierwsze próby zastosowania tej metody w badaniu ekspresji genów na poziomie DNA i mRNA. W poniższej pracy przedstawiono możliwości wykorzystania cytometrii w połączeniu z metodami amplifikacji *in situ* PCR i *in situ* RT-PCR oraz hybrydyzacji *in situ* ze znakowanymi sondami oligonukleotydowymi, do oceny niewielkich nawet ilości sekwencji nukleotydowych w komórkach. Przybliżono też stosowane w cytofluorymetrii techniki utrwalania i permeabilizacji błon komórkowych.

Słowa kluczowe: cytometria przepływowa, ekspresja genów, utrwalanie i permeabilizacja błon, *in situ* PCR, *in situ* RT-PCR, hybrydyzacja *in situ*, FISH

Summary: Flow cytometry is in common use in immunophenotyping and surface and intracellular protein analysis. Recently, the application of this method for studies of gene expression at DNA and RNA level were tested. The possibilities of detection of rare nucleic acid sequences in cells by using the combination of *in situ* PCR or RT-PCR and FISH followed by flow cytometry are presented. The methods of membrane fixation and permeabilization are discussed as well.

Key words: flow cytometry, gene expression, membrane fixation and permeabilization, *in situ* PCR, *in situ* RT-PCR, *in situ* hybridization, FISH

ZASTOSOWANIE CYTOMETRII PRZEPEŁYWOWEJ W BADANIU EKSPRESJI GENÓW

Cytometria przepływowa jest stosunkowo nową metodą, jej znaczący rozwój przypada na ostatnie 20 lat, podczas których cytometry wypróbowano w wirusologii, mikrobiologii, farmakologii, toksykologii i biotechnologii. Najwięcej jednak zastosowań znalazły one w naukach medycznych: immunologii i onkologii.

Cytometria w badaniach ekspresji genów

Ekspresję genów można badać na różnym poziomie. Cytometry przepływowe najczęściej wykorzystuje się do analizy antygenów i receptorów powierzchniowych, a zatem do oceny ekspresji genów na ostatnim etapie, jakim jest białko (rys. 1).

Taką cytometryczną analizę białek – antygenów na powierzchni komórki powszechnie wykorzystuje się w ocenie immunofenotypu [24]. Badania przeprowadzone na komórkach limfoidalnych są pomocne w diagnostyce i monitorowaniu chorób rozrostowych układu krwiotwórczego (zwłaszcza białaczek i chłoniaków), u pacjentów po przeszczepach czy po leczeniu immunosupresyjnym [10, 14, 24]. Analiza zmian stosunku liczby limfocytów T CD4⁺ do limfocytów T CD8⁺ pozwala określić stadium AIDS, zaś ocena ekspresji receptorów powierzchniowych na neutrofilach dostarcza informacji o zdolnościach adhezyjnych, chemotaktycznych i fagocytarnych tych komórek, a także ukazuje, jaką rolę pełnią poszczególne receptory w tak ważnych dla organizmu procesach [5, 22].

Tylko niektóre białka produkowane przez komórkę pojawiają się na jej powierzchni. Większość białek pozostaje na terenie cytoplazmy ukryta pod błoną komórkową, która stanowi barierę osłaniającą wewnątrz komórki przed środowiskiem zewnętrznym, utrudniając tym samym reakcję antygen-przeciwciała i analizę białek wewnątrzkomórkowych. Aby ułatwić przeciwciałom przenikanie przez błony na teren cytoplazmy, Hallden i Andersson [1, 7] zaproponowali, aby po utrwaleniu komórek w 4% paraformaldehydzie (5 minut, temperatura pokojowa) zwiększyć przepuszczalność ich błon przez potraktowanie ich łagodnym, niejonowym deterгентem (3–5 minut z 0,6% n-oktylo-β-D-glukopiranozydem). Po permeabilizacji komórki płucze się w PBS i poddaje w łaźni lodowej inkubacji z odpowiednimi przeciwciałami. W ten sposób analizowano ekspresję cytokin cytoplazmatycznych IL-1β oraz IFN-γ w subpopulacjach leukocytów [1, 15]. Paraformaldehyd uznawany jest za najlepszy z utrwalaczy, bowiem nie tylko stabilizuje błony komórkowe, ale także zachowuje nie zmienione wewnątrzkomórkowe antygeny oraz morfologię komórki, określaną w cytometrii przez parametry FSC i SSC. Używany do permeabilizacji błon n-oktylo-β-D-glukopiranozyd jest łatwy do wypłukania, nie zmie-

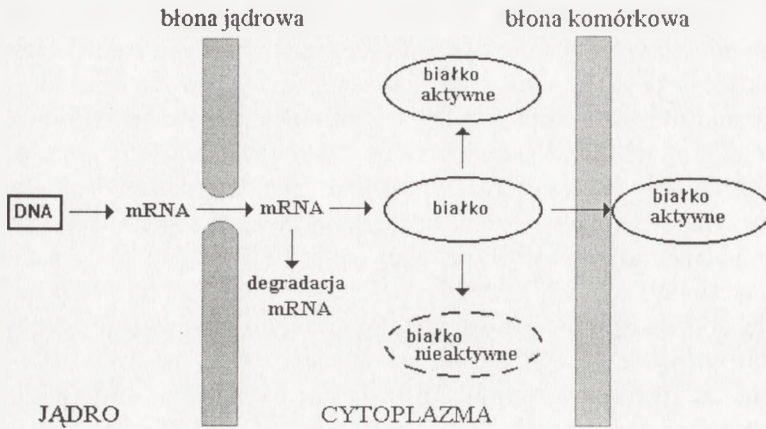
nia struktury białek ani aktywności enzymów. Ponadto utrwalenie i permeabilizacja błon nie miały wpływu na wybarwione uprzednio antygeny powierzchniowe.

W przypadku niektórych cytokin okazywało się jednak, że są one niewykrywalne po użyciu n-oktylo- β -D-glukopiranozydu. Sander [16] zastosował w takich przypadkach utrwalanie 4% paraformaldehydem, a następnie permeabilizację w 0,1% saponinie. Ten roślinny glikozyd prawdopodobnie włącza się do błony komórkowej w miejscu występowania cholesterolu, zwiększając jej przepuszczalność w sposób odwracalny, o czym świadczy konieczność ciągłej obecności saponiny podczas inkubacji z przeciwciałami i płukają. Dzięki tej metodzie zanalizowano lokalizację oraz kinetykę produkcji m.in. Il-1 α , Il-1 β , Il-2, Il-4, Il-6, TNF α , TNF β , IFN- γ .

Inną metodę do wykrywania przy pomocy cytometru czynnika martwicy nowotworów (TNF) produkowanego, ale nie uwalnianego przez komórki, zastosował Hsi [8]. Utrwalenie przeprowadzano w 0,5% paraformaldehydzie (5 minut, 4 $^{\circ}$ C), zaś do permeabilizacji użyto 0,1% Triton-X-100 (5 minut, 4 $^{\circ}$ C). Po wypłukaniu komórek w PBS poddawano je dalszym procedurom barwienia.

We współczesnej biologii stwierdzenie obecności lub braku białka nie jest wystarczające do zakończenia badań nad ekspresją genu. Analizując rysunek 1 łatwo zauważyć, że nie zawsze brak białka powodowany jest brakiem odpowiedniego mRNA. Złożony proces regulacji ekspresji genów działa na różnych etapach. Przyczyną zmniejszonej ilości lub braku białka na powierzchni komórki mogą być zaburzenia transportu, białko może ulegać na terenie cytoplazmy szybkiej degradacji albo dochodzi do blokady miejsca inicjacji translacji lub do degradacji mRNA, zanim translacja się zacznie. Konieczna staje się więc analiza ekspresji genów na wcześniejszym etapie, jakim jest mRNA. Analizę taką przeprowadza się również w przypadkach, gdy końcowym etapem ekspresji genu jest RNA.

Obecność swoistej sekwencji nukleotydowej (zarówno DNA, jak i RNA) wykrywa się metodami analogicznymi do metod detekcji białek wewnątrzkomórkowych, przy czym rolę przeciwciał pełnią sondy oligonukleotydowe odpowiednio wyznakowane. W reakcji hybrydyzacji wiążą się one swoicie, na zasadzie komplementarności, do analizowanego kwasu nukleinowego. Stosowane metody hybrydyzacji typu Northern i Southern wymagają wcześniejszej ekstrakcji kwasów nukleinowych z komórek. Informacje, jakich mogą zatem dostarczyć dotyczą obecności lub braku danej sekwencji w populacji oraz jej średniej ilości w przeliczeniu na pojedynczą komórkę. Utracone zostało powiązanie tych danych z poszczególnymi komórkami, a więc zmiana ilości danej sekwencji w próbce może oznaczać zarówno zmianę poziomu ekspresji odpowiedniego genu, jak i zmianę ilości komórek, w których do tej ekspresji dochodzi. Metodą nie mającą tej wady jest – przeprowadzana bez ekstrakcji kwasów nukleinowych z komórki – hybrydyzacja z sondami znakowanymi fluorescencyjnie, tzw. fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ* (FISH). Przeprowadzana może być na skrawkach tkankowych, rozmazach lub w zawiesinie, a jej efekt w postaci emitowanej fluorescencji oceniany jest w mikroskopie fluorescencyjnym



Rys. 1. Możliwe sposoby regulacji ekspresji genów, strzałki oznaczają możliwe miejsca kontroli

lub w cytometrze. Jednak dotarcie do konkretnej sekwencji nukleotydowej znajdującej się wewnątrz komórki wymaga – podobnie jak w przypadku białek cytoplazmatycznych – pokonania bariery, jaką jest błona komórkowa, a czasem również i jądrowa. Sekwencje te są jakby ukryte za zasłoną błon i w przypadku gdy ilość docelowych sekwencji w przeliczeniu na 1 komórkę jest bardzo niska, cytometria przepływowa może nie być wystarczająco czułą metodą do ilościowej oceny produktu hybrydyzacji. W takich próbkach przed hybrydyzacją przeprowadza się reakcję PCR *in situ* w celu zwiększenia ilości DNA lub RT-PCR *in situ* dla powielenia sekwencji mRNA. Przeprowadzenie reakcji amplifikacji i hybrydyzacji we wnętrzu komórki wymaga odpowiedniego jej przygotowania.

Komórki poddawane są utrwaleniu, a błony komórkowe są tak przygotowywane, by stały się przepuszczalne dla wolnych nukleotydów, primerów, enzymów i sond, natomiast by nie pozwalały produktom amplifikacji i hybrydyzacji wyciekać z komórki.

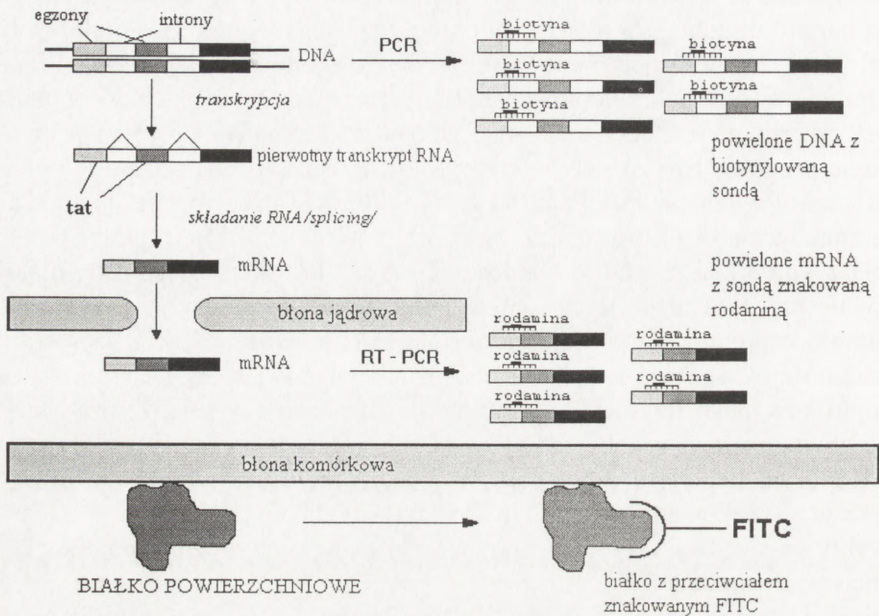
Najczęściej stosowanym w takich przypadkach utrwalaczem jest zbuforowana formalina, inne stosowane utrwalacze mogą powodować zmniejszenie wydajności hybrydyzacji lub degradację kwasów nukleinowych. Permeabilizacja błon polega w tym przypadku na bardzo łagodnym trawieniu enzymami proteolitycznymi, np. proteinazą K, trypsyną, pepsyną lub pronazą [3, 6].

Następnie w komórkach, które stają się miniprobówkami, przeprowadza się reakcje amplifikacji. Krytycznym punktem doświadczeń z reakcjami PCR/RT-PCR *in situ* jest utrzymanie produktów amplifikacji na miejscu reakcji, tzn. wewnątrz komórki. Pewną barierę utrudniającą dyfuzję amplifikantów stanowi błona komórkowa (i jądro), a także powstające w niewielkiej ilości tzw. długie produkty PCR [6, 23]. Są to fragmenty powstałe z kopiowania oryginalnej matrycy, o długości obejmującej odcinek od primera do końca nici, a nie tylko odcinek pomiędzy dwoma primerami. Te długie produkty tworzą sieć, w której zakotwiczone zostają pozostałe produkty amplifikacji. Po denaturacji, amplifikowaną sekwencję hybryduje się ze swoistą sondą znakowaną dużą cząsteczką digoksygeniny, dzięki czemu hybrydy nie dyfundują z komórki i można je uwidocznić przez reakcję ze znakowanym fluorescencyjnie przeciwciałem skierowanym przeciwko digoksygeninie [18].

Ostatnio zaproponowano, aby już reakcję PCR przeprowadzać z użyciem znakowanego digoksygeniną jednego z deoksynukleotydów, który po wprowadzeniu do amplifikowanego fragmentu kwasu nukleinowego spowoduje, że produkt PCR będzie zbyt obciążony, aby dyfundować z komórki i pozostanie w jej wnętrzu [12]. Kopie analizowanej sekwencji po denaturacji są identyfikowane przez hybrydyzację ze znakowaną – np. biotynylowaną – sondą oligonukleotydową, hybrydy zaś wykrywa się dzięki awidynie powiązanej z fluorochromem i pomiarze fluorescencji w cytometrze.

Dzięki zastosowaniu reakcji amplifikacji i hybrydyzacji *in situ*, przy pomocy cytometru przepływowego wykrywano mRNA dla II-1 [13], GAPDH [11], α - i γ -aktyny [19] oraz mRNA histonowe [4, 21]. Próbowano także wykorzystać tę metodę do identyfikacji mikroorganizmów, dzięki analizie charakterystycznych dla poszczególnych taksonów różnic w sekwencji 16S rRNA [20]. Ostatnie lata przyniosły pierwsze efekty prób użycia cytometrii wraz PCR/RT-PCR oraz hybrydyzacją *in situ* do diagnostyki i monitorowania pacjentów z nowotworami, po przeszczepach szpiku kostnego oraz z wirusowymi infekcjami [2, 12, 17]. Metoda ta może być także pomocna w określeniu nielicznych komórek białaczkowych we krwi (MRD – *minimal residual disease*) pozostałych u pacjenta po terapii [9].

W przypadku jednoczesnej analizy mRNA i DNA w obrębie jednej komórki bardzo ważny jest dobór odpowiednich primerów i sond. Muszą być one swoiste dla analizowanych sekwencji. Po przepisaniu mRNA na cDNA (przy użyciu enzymu odwrotnej transkryptazy) amplifikację DNA i cDNA można prowadzić jednocześnie. Primery i sondy używane do amplifikacji i detekcji cDNA są zwykle tak dobierane, że wiążą się w miejscu powstającym dopiero po procesie składania mRNA, np. w regionie sklejenia 2 egzonów. Gwarantuje to, że wykrywana sondą sekwencja występuje tylko w mRNA i cDNA, natomiast nie występuje w DNA i pierwotnym transkrypcie RNA, gdzie jest rozdzielona przez intron [3]. Sondy oprócz spełniania warunku swoistości muszą być rozróżnialne w cytometrze. Uzyskuje się to przez wyznakowanie fluorochromami emitującymi różne kolory fluorescencji.



Rys. 2. Jednoczesna analiza swoistych sekwencji DNA i mRNA oraz białka w obrębie jednej komórki

Na rysunku 2 na przykładzie analizy zainfekowanych wirusem HIV-1 leukocytów zilustrowano możliwość jednoczesnej detekcji swoistych sekwencji DNA i mRNA oraz białka, powiązanych z trzema kolorami fluorescencji. Komórki zainfekowane zawierają prowirusowe DNA, które wykrywa się po amplifikacji przez hybrydyzację z biotynylowaną sondą swoistą dla HIV-1. Jeśli wirus jest w stanie utajenia nie wykrywa się jego mRNA. Przy wyjściu ze stanu latencji jako jeden z pierwszych transkrypcji ulega gen regulatorowy *tat*, gdyż jego produkt białkowy jest niezbędny do transkrypcji innych genów wirusa. Obecność mRNA dla *tat* świadczy o uaktywnieniu wirusa. Sekwencja ta wykrywana jest po reakcji RT-PCR *in situ* przez hybrydyzację z sondą oligonukleotydową (znakowaną rodaminą), która łączy się komplementarnie do sekwencji powstałej po połączeniu dwóch egzonów tego genu. Przeciwciała znakowane FITC umożliwiają identyfikację zaatakowanych przez wirusa komórek układu odpornościowego [12].

Podczas wykonywania takich cytometrycznych analiz ważne jest dobranie odpowiednich kontroli. Przeprowadza się m. in. amplifikację bez dodanej polimerazy, bez odpowiednich primerów, w przypadku analizy mRNA także bez odwrotnej transkryptazy oraz hybrydyzację z sondami niekomplementarnymi. Dzięki temu można określić poziom swoistości i czułości metody. Aby potwierdzić utrzymanie produktów amplifikacji i hybrydyzacji wewnątrz komórki, część komórek ogląda się pod mikroskopem fluorescencyjnym.

PODSUMOWANIE

Zastosowanie cytometrii przepływowej do analizy ekspresji genów jest kwestią ostatnich kilkunastu lat. Obserwowany ciągły wzrost zainteresowania tą metodą spowodowany jest jej niewątpliwymi zaletami: dużą liczbą komórek analizowanych w niezwykle krótkim czasie, możliwością ilościowej analizy kilku parametrów jednocześnie i różnicowania na tej podstawie subpopulacji komórkowych, możliwością sortowania wybranych populacji komórkowych oraz wysoką czułością i powtarzalnością pomiarów. Mimo ograniczenia, jakim jest konieczność pracy z zawiesinami komórek, liczne ośrodki badawcze podejmują się rozwiązania przy pomocy tej metody wielu starych i nowych problemów biologicznych i medycznych.

PIŚMIENNICTWO

- [1] ANDERSSON U, HALLDEN G, PERSSON U, HED J, MOLLER G, DELEY M. Enumeration of IFN- γ -producing cells by flow cytometry. *J Immunol.Methods* 1988; **112**: 139–142.
- [2] ARKESTEIJN GJA, ERPELINCK SLA, MARTENS ACM, HAGENBEEK A. Chromosome specific DNA hybridization in suspension for flow cytometric detection of chimerism in bone marrow transplantation and leukemia. *Cytometry* 1995; **19**: 353–360.
- [3] BAGASRA O, SESHAMMA T, HANSEN J, BOBROSKIL, SAIKUMARI P, POMERANTZ RJ. Applications of *in situ* PCR methods in molecular biology. [w] Jiang Gu [red] *In Situ Polymerase Chain Reaction and related technology*. Boston: Eaton Publishing 1995: 35–67.
- [4] BAINS MA, AGARWAL R, PRINGLE JH, HUTCHINSON RM, LAUDER I. Flow cytometry quantitation of sequence-specific mRNA in hemopoietic cell suspensions by primer-induced *in situ* (PRINS) fluorescent nucleotide labeling. *Experimental Cell Research* 1993; **208**: 321–326.
- [5] COON JS, WEINSTEIN RS. Techniques in diagnostic pathology: Diagnostic flow cytometry. Williams & Wilkins, Baltimore, Hong Kong, London, Sydney; USA 1991.
- [6] GU J. *In Situ* PCR – an overview. [w] Jiang Gu [red] *In Situ Polymerase Chain Reaction and related technology*. Boston: Eaton Publishing 1995: 1–21.
- [7] HALLDENG, ANDERSON U, HED J, JOHANSSON SGO: A new membrane permeabilization method for the detection of intracellular antigens by flow cytometry. *J Immunol Methods* 1989; **124**: 103–109.

- [8] HSI ED, REMICK DG: Rapid determination of cell-associated tumor necrosis factor production by flow cytometry. *Laboratory Investigation* 1993; **68**: 740-745.
- [9] KAWIAK J, HOSER G. Ekspresja genów w komórkach określana cytometrią przepływową. *Post Biol Kom* 1994; **21**, supl. 3: 39-48.
- [10] KAWIAK J, SKIERSKI J. Cytometria przepływowa w badaniach komórek i niektóre jej zastosowania lekarskie. *Post Biol Kom* 1992; **19**: 239-254.
- [11] LALLI E, GIBELLINI D, SANTI S, FACCHINI A. *In Situ* hybridization in suspension and flow cytometry as a tool for the study of gene expression. *Anal Biochem* 1992; **207**: 298-303.
- [12] PATTERSON BK, TILL M, OTTO P, GOOLSBY C, FURTADO MR, MCBRIDE LJ, WOLINSKY SM. Detection of HIV-1 DNA and messenger RNA in individual cells by PCR-driven *in situ* hybridization and flow cytometry. *Science* 1993; **260**: 976-979.
- [13] PENNLINE K, PELLERITO-BESSETTE F, UMLAND S, SIEGEL M, SMITH S. Detection of *in vivo*-induced II-1 mRNA in murine cells by flow cytometry (FC) and fluorescent *in situ* hybridization (FISH). *Lymphokine and Cytokine Research* 1992; **11**(1): 65-71.
- [14] PITUCH-NOWOROLSKA A. Zastosowanie cytometrii przepływowej do diagnostyki białaczek i chłoniaków nieziarnicznych. *Central-European J Immunology* 1996; **21**: 138-146.
- [15] PRYJMA J, ZEMBALA M, ERNST M, FLAD HD: Preactivation and phenotype of monocytes have no influence on their elimination from culture by activated T lymphocytes. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis* 1995; **43**: 31-35.
- [16] SANDER B, ANDERSSON J, ANDERSSON U. Assessment of cytokines by immunofluorescence and the paraformaldehyde-saponin procedure. *Immunol Rev* 1991; **119**: 65-93.
- [17] TESTONI N, MARTINELLI G, FARABEGOLI P, ZACCARIA A, AMABILE M, RASPADORI D, PELLICONI S, ZUFFA E, CARBONIC, TURA S. A new method of "in-cell reverse transcriptase-polymerase chain reaction" for the detection of BCR/ABL transcript in chronic myeloid leukemia patients. *Blood* 1996; **87**(9): 3822-3827.
- [18] TIMM EA, PODNIESINSKI E, DUCKETT L, CARDOTT J, STEWART CC. Amplification and detection of a Y-chromosome DNA sequence by fluorescence *in situ* polymerase chain reaction and flow cytometry using cells in suspension. *Cytometry* 1995; **22**: 250-255.
- [19] TIMM EA, STEWART CC. Fluorescent *in situ* hybridization in suspension (FISHES) using digoxigenin-labeled probes and flow cytometry. *BioTechniques* 1992; **12**(3): 362-367.
- [20] WALLNER G, AMANN R, BEISKER W. Optimizing fluorescent *in situ* hybridization with rRNA-targeted oligonucleotide probes for flow cytometric identification of microorganisms. *Cytometry* 1993; **14**: 136-143.
- [21] YU H, ERNST L, WAGNER M, WAGGONER A. Sensitive detection of RNAs in single cells by flow cytometry. *Nucleic Acids Res* 1992; **20**(1): 83-88.
- [22] ZEMAN K. Cytometria przepływowa w badaniach neutrofilów. *Central-European J Immunology* 1996; **21**: 128-137.
- [23] ZEVALLOS EA, BARD E, ANDERSON VM, CHOI TS, GU J. Conventional PCR, *in situ* PCR and reverse transcription *in situ* PCR for HIV detection. [w] Jiang Gu [red] *In Situ Polymerase Chain Reaction and related technology*. Boston: Eaton Publishing 1995: 77-98.
- [24] ŻEROMSKI J, DWORACKI G. Ocena immunofenotypu komórek limfoidalnych przy pomocy cytometrii przepływowej – uwagi praktyczne i zastosowania kliniczne. *Central-European J Immunology* 1996; **21**: 99-106.

Otrzymano: –

Przyjęto: 24.06. 1997 r.

Adres autora: 31-120 Kraków, Al. Mickiewicza 3.

KOMUNIKATY

Komunikat Fundacji Biologii Komórki i Biologii Molekularnej

Zarząd Fundacji Biologii Komórki i Biologii Molekularnej przyznaje doroczną nagrodę naukową, w tym również w roku 1996 i 1997, za wyróżniającą się oryginalną pracę z zakresu biologii komórki, indywidualną lub zespołową, wykonaną wyłącznie w krajowej placówce naukowej, opublikowaną w ostatnich dwóch latach w czasopiśmie figurującym w Current Content bądź Medline.

Zgłoszenia wraz z dwoma odbitkami należy kierować do dnia 15 listopada każdego roku pod adresem Fundacji. Regulamin nagrody poniżej.

Fundacja Biologii Komórki i Biologii Molekularnej
ul. Marymoncka 99, 01-813 Warszawa
tel. 34-03-44, fax 3404470

Regulamin

dorocznej nagrody Fundacji Biologii Komórki i Biologii Molekularnej

- * **1.** Raz w roku przyznawana będzie jedna nagroda za wyróżniającą się, oryginalną pracę z zakresu biologii komórki, indywidualną lub zespołową, wykonaną wyłącznie w krajowej placówce naukowej.
- * **2.** Praca musi być wydrukowana w czasopiśmie naukowym referowanym w Current Content.
- * **3.** Praca powinna być opublikowana nie wcześniej niż w ostatnich dwóch latach poprzedzających nadanie nagrody.
- * **4.** Preferowane będą prace młodych autorów.
- * **5.** Wysokość nagrody w danym roku kalendarzowym ustala Zarząd Fundacji.
- * **6.** Zgłaszać pracę do nagrody może każdy.
- * **7.** Pracę należy zgłaszać do Zarządu Fundacji ul. Marymoncka 99, 01-813 Warszawa, pokój 314 do 15 października każdego roku.
- * **8.** Ocenę kwalifikującą prace do nagrody przeprowadza Komisja Nagród powołana przez Zarząd Fundacji zasięgając w razie potrzeby opinii specjalistów.
- * **9.** Decyzja Komisji ogłaszana będzie w "Postęпах Biologii Komórki".
- * **10.** Nagroda wręczana będzie w czasie jednej z konferencji naukowych z zakresu biologii komórki.

Wskazówki przygotowania rysunków do publikacji w PBK

Dostarczane na dyskietkach teksty powinny być napisane w Wordzie, wersja 6,0 lub wcześniejsza. Jeśli w tekst zostały wstawione rysunki, powinny one zostać umieszczone osobno na dyskietce. Powinny to być albo mapy bitowe (.TIF, .PCX), albo pliki z Corela, wersja 5,0 lub wcześniejsza. Każda wersja Worda lub Corela pozwala na zachowanie pracy w formacie wersji wcześniejszej.

Cennik odbitek prac dla Autorów w 1997 r.

Liczba odbitek	50	100	200	400
Cena zł	40,00	60,00	80,00	100,00

Zamówienie na odbitki **musi** być złożone wraz z przesłaną korektą pracy.

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

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

Tekst pracy i załączniki należy przysyłać w dwóch egzemplarzach na adres redakcji w Warszawie bądź jednego z Redaktorów (adresy na 2 str. okładki). Maszynopis powinien być pisany jednostronnie na papierze formatu A4 z podwójną interlinią i marginesem 4 cm po lewej stronie. Strony powinny być kolejno numerowane. Nadesłanie tekstu pracy, poprawionego po recenzjach, na dyskietce przyspieszy publikację,

Pierwsza strona nie numerowana przeznaczona jest dla redakcji i powinna zawierać: imiona i nazwiska autorów oraz ich tytuły naukowe, adresy w pracy i domowy 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, informację o dofinansowaniu pracy oraz skrót tytułu (do 40 znaków). Następna strona powinna zawierać w języku polskim i angielskim streszczenie (do 150 słów) oraz słowa kluczowe – 3 do 10 słów zgodnych z terminami w Medical Subject Headings (Index Medicus), o ile są tam zawarte. 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, a jedynie zaznaczyć ołówkiem na marginesie ich lokalizację (np. tab. 1, rys. 1 itp.). Dla przejrzystości tekst można podzielić na tytułowane i numerowane rozdziały oraz podrozdziały. 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 zestawiać alfabetycznie według następującego wzoru:

[1] HNILICA 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 powinny być kontrastowe i wykonane na błyszczącym papierze. Wymiary poszczególnych rysunków, schematów i fotografii nie mogą przekraczać 125 × 180 mm lub ich połowy. Jeżeli załączniki są zapożyczone z innych źródeł, należy podać, skąd zostały zaczerpnięte i dotężyć 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 1 egz. zeszytu PBK z opublikowaną pracą, a ponadto mogą zamówić odbitki odpłatnie.

Redakcja prosi o propozycję do 5 osób (nazwisko, imię, adres, fax), które byłyby odpowiednimi recenzentami maszynopisu, nie powinny jednak być aktualnymi współpracownikami ani pracownikami instytucji, w której pracuje autor. Redakcja prosi także głównego Autora o dołączenie do maszynopisu podpisanej odpowiedzi na następujące pytania:

Dołączono 2 kopie maszynopisu,
tabel i rycin.

Treść pracy nie była uprzednio publikowana i nie została
tak **nie** wysłana do innej redakcji. **tak nie**

Wszyscy Autorzy znają i akceptują pracę.

tak nie Dołączono kopie pracy na dyskietce z podaniem nazwy

Jest zgoda osób, których informacje niepubli-

tak nie pliku i użytego programu edycyjnego z komputera IBM **tak nie**

kowane są zamieszczone w tekście artykułu **tak**

nie Odpowiadam za całość pracy opisanej w zał. maszyn. **tak nie**

Wyrażam zgodę na to, że artykuł po przyjęciu do druku w „Postęпах Biologii Komórki” przechodzi na własność
redakcji i jego reprodukcja wymaga zgody redakcji.

data **podpis**

TREŚĆ

GIEL-PIETRASZUK M., BARCISZEWSKA M. Z., BARCISZEWSKI J.: Oddziaływanie kwasów nukleinowych z białkami	1
JEZIERSKI G.: Modelowanie molekularne oddziaływania trp represor – DNA	21
WĘGRZYN G.: Antyterminacja transkrypcji u bakteriofaga λ	37
WĘGRZYN G., WĘGRZYN A.: Aktywacja transkrypcji w komórkach <i>Escherichia coli</i>	53
BARTNIK E.: Ludzki genom mitochondrialny – mutacje, polimorfizmy i choroby	69
WÓJCIK K. J.: Regulacja syntezy czynników wirulencji w komórkach szczepów <i>Staphylococcus aureus</i> .	77
MADEJA Z.: Ilościowe metody analizy obrazu w genetyce molekularnej	87
JURKIEWICZ A., CZYŻ J.: Wpływ czynników mechanicznych na aktywność proliferacyjną i ekspresję genów w komórkach zwierzęcych	101
DUDA A.: Zastosowanie cytometrii przepływowej w badaniu ekspresji genów	119
Komunikaty	127
Wskazówki przygotowania rysunków	128

Warunki prenumeraty kwartalnika POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI

Prenumerata na rok 1997

Redakcja przyjmuje opłatę prenumeraty za rok 1997 na konto:

FUNDACJA BIOLOGII KOMÓRKI I BIOLOGII MOLEKULARNEJ, ul. Marymoncka
99, 01-813 Warszawa; Bank Polska Kasa Opieki S. A.,
IV O/Warszawa 12401053-40006576-2700-401112-001.

Cena prenumeraty rocznika na rok 1998:

dla instytucji (bibliotek) wynosi 60 zł,
a dla odbiorców indywidualnych 20 zł.

Subscription orders for POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI for 1997 should be placed
at local press distributors or directly at Editorial Board of POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI,
Marymoncka str. 99, 01-813 Warszawa /Poland, account No:

FUNDACJA BIOLOGII KOMÓRKI I BIOLOGII MOLEKULARNEJ, ul. Marymoncka
99, 01-813 Warszawa; Bank Polska Kasa Opieki S. A.,
IV O/Warszawa 12401053-40006576-2700-401112-001.

Price per year 20 dollars USA.

Indeks 369705