POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE

postępy biochemii

PL ISSN
0032-5422

Advances in Biochemistry

TOM 38, NR 2, 1992

Cysteine regulon 46
Największy gen człowieka 49
UvrABC-endonukleaza 55
System SOS 59
Rybozymy—katalityczne RNA 64
Zastosowanie PCR w diagnostyce . 75
Słownictwo glikoprotein 81

http://rcin.org.pl

HP HAND-PROD sp. z o.o.

oferuje:

odczynniki diagnostyczne i biochemiczne

(ceny katalogowe)

mannheim boehringer

Boehringer Mannheim GmbH

odczynniki chemiczne

(ceny katalogowe)

Riedel-de Haën

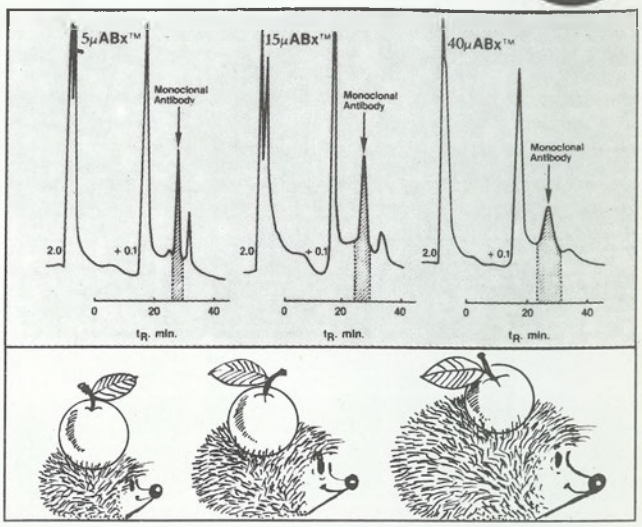
Über 160 Jahre Erfahrung in der Chemie

HP HAND-PROD sp. z o.o.

Biuro Handlowe:
PL-01-113 WARSZAWA
ul. Ulrychowska 26
Tel. Fax 37-42-35
Tlx 6105756 MUL LU

Jednakowa powierzchnia wszystkich ziaren BAKERBOND

J.T.Baker

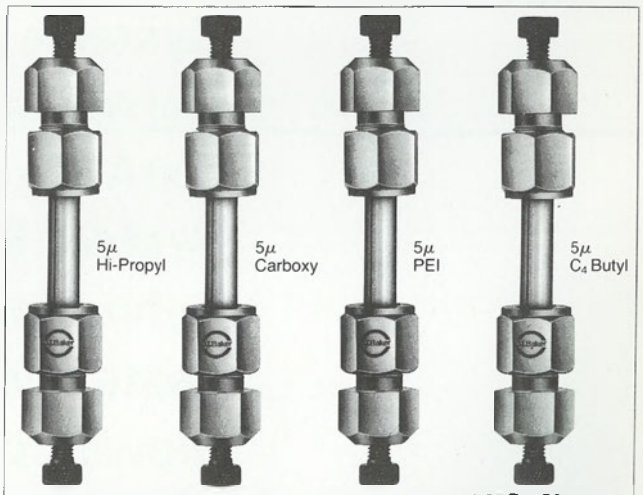


Szeroka gama zastosowań faz BAKERBOND

Chemicznie związane fazy do chromatografii cieczowej BAKERBOND niezależnie od granulacji krzemionki 5 μm, 15 μm, 40 μm, mają zawsze jednakowe chemiczne pokrycie powierzchni. Jednolitość pokrycia grupami funkcyjnymi jest gwarantowana dla wszystkich serii produkcyjnych. Umożliwia to uzyskiwanie stałych wyników oraz łatwość przejścia od procedury analitycznej, poprzez rozdział preparatywny do oczyszczania na skalę przemysłową. Informacje szczegółowe:
EUROCOLOR Chemikalia Laboratoryjne, skr. poczt. 46,
90-980 Łódź-7, tel. 81 31 40, tlx 88 53 67 zab.
fax 81 52 83 (Skład celny ul. Tylna 3)

Szybki rozdział białek! Cztery kolumny HPLC BAKERBOND W-P SCOUT

J.T.Baker



BAKERBOND Wide-Pore SCOUT HPLC-Säulen 4.6 i.D. x 50 mm

Wybór metody + krótka analiza HPLC

Za pomocą kolumn z wypełnieniem szerokoporowatym BAKERBOND W-P SCOUT (4,6 × 50 mm) można w krótkim czasie opracować metodę rozdziału oraz przeprowadzić analizę. Kolumna Hi-propylowa ma właściwości uniwersalne i nadaje się do rozdziału wszystkich białek. Przy pomocy kolumny karboksylowej (WCX) można rozdzielać białka o punkcie izoelektrycznym 6-12. Kolumna PEI (WAX) szczególnie dobrze rozdziela białka mające punkt izoelektryczny 7-3. Dla hormonów, stabilnych białek i niskocząsteczkowych peptydów o ilości reszt aminokwasowych < 100 poleca się kolumnę butylową C_4. Każda kolumna ma pojemność 90 mg/g w jednym rozdziale chromatograficznym.

Broszurę na temat szerokoporowatych faz BAKERBOND W-P można otrzymać w:
EUROCOLOR Chemikalia Laboratoryjne, skr. poczt. 46,
90-980 Łódź-7, tel. 81 31 40, tlx 88 53 67 zab.

http://rcin.org.pl

POSTĘPY BIOCHEMII

WYDAWCA
Editor
POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE
Polish Biochemical Society
16 Freta Street
00-227 Warszawa
Poland

Oficyna wydawnicza
BIO-TEXT sp. z o. o.
Dantego 1/49
01-914 Warszawa

REDAKCJA
Editorial Board

REDAKTOR NACZELNY
Editor in chief
ZOFIA ZIELIŃSKA
tel. 31-24-03

REDAKTORZY
Editors
GRAŻYNA PALAMARCZYK
tel. 49-04-15
ANDRZEJ JERZMANOWSKI
tel. 20-03-81 w. 488
JACEK KUŹNICKI
tel. 659-31-43
fax: (22) 22-53-42
BOŻENA SZYMANOWSKA

RECENZENCI ZESZYTU
Referees of this issue
Jan Barciszewski
(Poznań)
Ewa Bartnik
(Warszawa)
Andrzej Jerzmanowski
(Warszawa)
Grażyna Palamarczyk
(Warszawa)

ADRES REDAKCJI
Address
REDAKCJA
„POSTĘPÓW BIOCHEMII"
INSTYTUT BIOLOGII DOŚWIADCZALNEJ
im. M. Nenckiego PAN
ul. Pasteura 3
02-093 Warszawa
tel. (22) 659-85-71
fax: (22) 22-53-42
telex: 81-48-92

SPIS TREŚCI
CONTENS

Cysteine Regulon of *Enterobacteriaceae*
MAŁGORZATA ZATYKA, AGNIESZKA SIRKO, GRAŻYNA JAGURA-BURDZY, MONIKA HRYNIEWICZ, DANUTA HULANICKA . . 46

Gen DMD — największy gen człowieka
DMD gene — the largest human gene
JOLANTA KWIATKOWSKA, RYSZARD SŁOMSKI . 49

Enzymy naprawiające DNA: UvrABC-endonukleaza *Escherichia coli*
DNA repair enzymes: UvrABC-endonuclease of *Escherichia coli*
CELINA JANION 55

System SOS: Mutagenna odpowiedź komórki na uszkodzenia DNA
SOS system: Mutagenic response to DNA damage
ELŻBIETA GRZESIUK 59

Rybozymy — katalityczne cząsteczki RNA
Ribozymes — catalytical RNA molecules
ANNA MARIA CHACHULSKA 64

Zastosowanie reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR) w diagnostyce klinicznej
Application of the polymerase chain reaction in clinical diagnostics
RYSZARD SŁOMSKI, HANNA CHLEBOWSKA, JOCHEN REISS 75

Słownictwo glikoprotein, glikopeptydów i peptydoglikanów
Opracował Andrzej Gamian 81

http://rcin.org.pl

Cysteine Regulon of *Enterobacteriaceae*

MAŁGORZATA ZATYKA[1]
AGNIESZKA SIRKO[2]
GRAŻYNA JAGURA-BURDZY[2]
MONIKA HRYNIEWICZ[2]
DANUTA HULANICKA[3]

Abreviations:
CBS-J1 — binding site of CysB protein in the promoter region of cysJ gene; CBS-K1, CBS-K2 — binding sites of CysB protein in the promoter region of cysK gene; OAS — O-acetyl-L-serine; PCR — polymerase chain reaction; SBP — sulfate binding protein; TSBP — thiosulfate binding protein

Sulfate, the main sulfur source in the environment can be reduced by two distinct enzymatic systems: a dissimilatory for energy production and an assimilatory for biosynthetic purpose. Reduction of sulfate to sulfide and its covalent binding to carbone occurs mainly in microorganisms and plants which then provide reduced organic sulfur compounds for all other life forms. This unique position of cysteine as a funnel for sulfur assimilation makes the regulation of its biosynthesis, not only an important aspect of amino acid metabolism but also a key step in the sulfur cycle [1, 2, 3].

In *Salmonella typhimurium* and *E. coli* cysteine biosynthesis constitutes a branched, convergent pathway. Genes coding for enzymes of cysteine biosynthesis in these bacteria are scattered over the chromosome forming a regulon. Cysteine regulon in *Enterobacteriaceae* is positively regulated by the CysB, an activator protein. In addition, derepression of this pathway requires O-acetyl- serine (OAS), and sulfur limitation [4].

We have been working on sulfate metabolism in *Enterobacteriaceae* for several years, concentrating at the beginning, on identificaton of unknown cysteine genes and mechansm of their expression. At that time growth inhibitors were often used as a tool in studies on a regulation of gene expression. Studies on the mechanism of growth inhibition of *Enterobacteriaceae* led us to the identification of the *cysK* gene, coding for O-acetylserine (thiol) lyase-A (formely designated O-acetyl sulfhydrylase) and a finding that the same enzyme catalyzes a reaction between OAS and 1, 2, 4 triazole giving 1, 2, 4-triazolealanine as a product [5, 6, 7, 8,]. This reaction significantly lowers the levels of several of the enzymes necessary for sulfate reduction by diminishing the cellular concentration of the internal inducer — OAS. The inhibition of bacterial growth probably results from L-cysteine starvation, caused by a decreased availability of cysteine precursors.

The isolation of the triazole resistant mutant mapping in the *cysE* gene confirmed the triazole resistance mechanism [9]. A high level of serine transacetylase of this mutant, the enzyme encoded by cysE gene, resulted from a mutation in the promotor region. Sequencing of regulatory region of this mutant a few years later showed one base change in -10 box of promoter region as compared with the wild type (unpublished results).

The prototrophy of *cysK* mutants indicates that there is another enzyme catalyzing sulfhydrylation of OAS, O-acetylserine (thiol) lyase-B. We have isolated mutants lacking the activity of this enzyme. The *locus* responsible for this defect has been designated *cysM* [10]. A few years later N a k a m u r a et al have found that O-acetylserine (thiol) lyase-B catalyzes also the synthesis of S-sulfocysteine from OAS and thiosulfate [11]. Presumably, S-sulfocysteine is then hydrolyzed to L-cysteine and sulfate or reduced by glutatione to L-cysteine and sulfite [12] thereby eliminating the need to reduce inorganic sulfur to the level of sulfide. Our observation that *cysM* mutants when grown anaerobically are cysteine bradytrophs [13] suggests that in its natural enteric environment, which is essentially anaerobic, *Enterobacteriaceae* prefer to synthesize L-cysteine from tiosulfate via S-sulfocysteine.

Isolation of regulatory mutants facilitates studies on the mechanism of gene expression. We have developed methods for the isolation of constitutive regulatory

[1] mgr, [2] dr, [3] prof. dr hab., Instytut Biochemii i Biofizyki PAN, Warszawa, ul. Rakowiecka 36.

http://rcin.org.pl

mutants in the cysteine regulon. All of these mutations mapped in the cysB locus. Strains carrying these mutations showed a high level of cysteine enzymes, not repressible by cysteine [14, 15].

Since the degree of DNA supercoiling appears to be an important factor in the control of gene expression [16], it was of interest to check whether the expression of cysteine regulon depends on DNA topology. Gyrase inhibitors of both units of this enzyme, nalidixic acid and novobiocin, decreased the expression of cysteine genes being under control of CysB protein [17]. In addition the expression of *cysB*, the regulatory gene of this system was also sensitive to gyrase inhibitors [18]. The amount of *cysB* specific mRNA found in cells grown in the presence of inhibitors was significantly lower as compared with the control. However, gyrase inhibitors have pleiotropic effects on cellular metabolism. Urea affects thermodenaturation profile of DNA, but it does not interfere with overall cellular metabolism. This makes urea particularly useful in studies of the dependence of gene expression on DNA topology. Urea, like the gyrase inhibitors, decreased the *cysB* gene expression [18], which suggested that DNA topology might play a role in cysteine regulon expression.

The other line of our research concerned the regulation of the *cysB* gene expression. The best method to study the expression of genes the products of which have no enzymatic activities is a fusion technique [19]. A regulatory region of the studied gene is fused to a gene with easily monitored product. We have constructed several operon fusions of the *cysB* gene with *lacZ* gene [20]. The observed decrease of B-galactosidase activity in the presence of $cysB^+$ allele indicated that the gene is autoregulated. The finding, that the amount of mRNA transcribed from *cysB* gene promoter is significantly reduced after the introduction of $cysB^+$ gene on multicopy plasmid, suggests that the CysB protein inhibits the transcription of its own gene [21]. A few years later our results have been confirmed by *in vitro* assay in dr. K r e d i c h s laboratory [22].

Later, when genetic engineering techniques become available, we cloned and sequenced several cysteine genes: *cysE*, *cysK*, *cysM* [23-26].

The *cysB* gene of *S. typhimurium* and *E. coli* showed 80,5% identity in the *cysB* coding region. In both proteins a helix-turn-helix region has been found, similar to that found in other DNA-binding proteins [26, 27].

Recently, we have studied sulfate transport system in *Enterobacteriaceae*. The term "sulfate permease" is commonly used for designation of the active transport system, which ensures the entrance of sulfate to the interior of bacterial cell. This process, unlike other steps of cysteine biosynthesis, has not been well described. Mutations impairing sulfate uptake, denoted *cysA*, were localized on chromosome of *E. coli* and *S. typhimurium* [28, 29]. Besides, a sulfate binding protein (SBP) of *S. typhimurium* was isolated, purified and its amino acids sequence was determined [30]. However, despite numerous attempts the gene coding for SBP has not been found [31]. Genetic experiment indicated the presence of three complementation groups in *cysA* region [28]. Using mini-Mu replicon technique we have cloned a region of *E. coli* [24] complementing *cysA* mutants, impaired in sulfate transport. The *cysB* dependent promoter governing the expression of sulfate transport system was identified in the cloned fragment and the direction of transcription has been established [32]. Sequencing of this region (7.000 bp) and its analysis revealed the presence of five open reading frames, designated *cysP*, *cysT*, *cysW*, *cysA* and *cysM* [33]. The deduced amino acids sequence of the *cysP* gene indicates the presence of a signal peptide. The amino acids sequence of *CysP* protein was found to be different from the sequence of the SBP protein of *Salmonella typhimurium*. Construction of a *cysP* insertional mutant and assays of binding and uptake of sulfate and thiosulfate by this mutant identified the *cysP* gene product as a thiosulfate binding protein (TSBP) [34]. The deduced amino acids sequences of *cysT* and *cysW* polipeptides include a substial number of hydrophobic residues. The hydropathy profiles and the location of transmembrane segments of these polypeptides are similar to membrane-bound components of other, binding protein dependent transport systems. The *cysA* sequence showed similarity with the "conserved" component common for such systems and contained a consensus sequence for ATP binding domain. Therefore, it seems likely that CysA protein serves as an energy coupling component. Expression of five genes (*cysPTWAM*) was analyzed in the T7 promoter-polymerase system [33].

All the above results indicate that the organization of sulfate transport system in *Enterobacteriaceae* is similar to that of other periplasmic permeases [35].

Investigations were also undertaken to identify the gene encoding SBP, designated, *cysX*. PCR technique has been used to amplify the *cysX* gene from chromosomal DNA [36]. The amplified fragment containing *cysX* gene has been cloned and its sequence was determined. K o h a r a library on phage has been used to map *cysX* on *E. coli* chromosome [37]. The *cysX* gene is located on 89′ minute of the chromosome. The insertion of "kanamycin cassette" into *cysX* gene in plasmid and the integration of this mutated gene into chromosome enabled us the construction of *cysX* mutant. Assay of the sulfate binding activity showed its lack in this mutant [38]. However, the *cysX* mutant, similarly to the *cysP* insertional mutant, is a cysteine prototroph. Cysteine auxotrophy appeared in the double mutant *cysX cysP* [38]. Since mutants lacking sulfate permease are also defective in thiosulfate uptake it appears that transport of these two anions (sulfate and thiosulfate) utilizes the same membrane components (*cysT*, *cysW*, and *cysA* proteins).

http://rcin.org.pl

Further development of molecular biology techniques such as DNase I footprinting, gel retardation, runoff transcription enabled the *in vitro* studies of protein interactions with the regulatory regions of genes. Positive regulation of procaryotic gene expression frequently involves binding of an activator protein immediately upstream of the -35 promoter region, that enables formation of a transcription complex, either through an interaction with RNA polymerase or by affecting the DNA itself or both [39].

In vitro studies in dr Kredich laboratory (Duke University, USA) on the interaction of CysB protein with regulatory regions of the *cysJ*, *cysK* and *cysP* genes revealed, that "the mode" of CysB binding to the particular promoters is different. In the case of the *cysJ* promoter one binding site CBS-J1 was identified [40], in the *cysK* promoter region two binding sites have been found (CBS-K1 and CBS-K2) [41] whereas, there were three binding sites in the regulatory region of the *cysP* gene [42]. The binding of CysB protein proceeds without the inducers either OAS or N-acetyl-L-serine. However, the presence of an inducer, not only stimulated the binding of CysB but was necessary for the transcription initiation. Runoff transcription experiments have showed that sulfide inhibits both transcription initiation and binding by competing with the inducer [42]. These findings indicate that sulfide is an anti-inducer and may explain why the full expression of the cysteine regulon requires sulfur limitation. L-cysteine did not affect *in vitro* transcription initiation or binding of CysB protein to the *cysJ* promoter region. The effects of L-cysteine observed *in vivo* may result from its degradation to sulfide by the inducible enzyme cysteine desulfhydrase [40].

The studies described above resulted in important findings which allowed the elucidation of the mechanism of cysteine biosynthesis regulation. However, there are still some obscure points in this system, for example the regulation of *cysE* gene expression. This gene is not under control of CysB protein.

It is worth noting that all the results obtained in the *in vitro* experiments using new molecular biology techniques, confirmed the general picture of cysteine biosynthesis regulation, established previously by classical genetic and biochemical methods.

Artykuł otrzymano 10 stycznia 1992 r.
Zaakceptowano do druku 13 lutego 1992 r.

References

1. Cooper AJ (1983) *Ann Rev Biochem* **52**: 187-222
2. Kredich NM, Hulanicka D, Hallquist SG (1980) *Sulfur Biology, Ciba Foundation Sympozium* **72**: 87-92
3. Kredich NM (1987) W: Neidhardt FC (red) Escherichia coli and Salmonella typhimurium cellular and molecular biology American Society for Microbiology, Washington DC p. 412-419
4. Ostrowski J, Kredich NM (1990) *J Bacteriol* **172**: 779-785
5. Hulanicka D, Kłopotowski T, Smith DA (1972) *J Gen Microbiol* **72**: 291-301
6. Hulanicka D, Kłopotowski T (1972) *Acta Biochim Polon* **19**: 251-260
7. Hulanicka D, Kredich NM, Treiman DM (1974) *J Biol Chem* **249**: 867-872
8. Kredich NM, Foote LJ, Hulanicka D (1975) *J Biol Chem* **250**: 7324-7331
9. Hulanicka D, Kredich NM (1976) *Mol Gen Genet* **148**: 143-148
10. Hulanicka D, Hallquist SG, Kredich NM, Mojica AT (1979) *J Bacteriol* **140**: 141-146
11. Nakamura T, Iwahashi H, Euguchi Y (1984) *J Bacteriol* **158**: 1122-1127
12. Woodin TS, Segel I (1968) *Biochim Biophys Acta* **167**: 78-88
13. Filutowicz M, Wiater A, Hulanicka D (1982) *J Gen Microbiol* **126**: 1791-1794
14. Śledziewska E, Hulanicka D (1978) *Mol Gen Genet* **165**: 289-293
15. Hryniewicz M, Pałucha A, Hulanicka MD (1988) *J Gen Microbiol* **134**: 763-769
16. Smith GR (1981) *Cell* **24**: 559-600
17. Ostrowski J, Hulanicka D (1981) *Mol Gen Genet* **181**: 363-366
18. Bielińska A, Hulanicka D (1986) *J Gen Microbiol* **132**: 2571-2576
19. Casadaban MJ, Cohen SN (1979) *Proc Natl Acad Sci USA* **76**: 4530-4533
20. Jagura-Burdzy G, Hulanicka D (1981) *J Bacteriol* **147**: 744-751
21. Bielińska A, Hulanicka D (1986) *Acta Biochim Polon* **33**: 133-137
22. Ostrowski J, Kredich NM (1991) *J Bacteriol* **173**: in press
23. Hulanicka D, Garret C, Jagura-Burdzy G, Kredich NJ (1986) *J Bacteriol* **168**: 322-327
24. Sirko AE, Zatyka M, Hulanicka D (1987) *J Gen Microbiol* **133**: 2719-2725
25. Sirko A, Hulanicka D (1988) *Acta Biochim Polon* **35**: 51-55
26. Jagura-Burdzy G, Kredich NM (1983) *J Bacteriol* **155**: 578-585
27. Ostrowski J, Jagura-Burdzy G, Kredich NM (1987) *J Biol Chem* **262**: 5999-6005
28. Dreyfuss J (1964) *J Biol Chem* **239**: 2292-2297
29. Karbonowska H, Wiater A, Hulanicka D (1977) *Acta Biochim Polon* **24**: 329-334
30. Pardee AB (1966) *J Biol Chem* **241**: 5886-5892
31. Ohta N, Galsworthy PR, Pardee AB (1971) *J Bacteriol* **105**: 1053-1062
32. Hryniewicz M, Sirko A, Hulanicka D (1989) *Acta Biochim Polon* **36**: 353-363
33. Sirko A, Hryniewicz M, Hulanicka D, Bock A (1990) *J Bacteriol* **172**: 3351-3357
34. Hryniewicz M, Sirko A, Pałucha A, Bock A, Hulanicka D (1990) *J Bacteriol* **172**: 3358-3366
35. Ames GFL (1986) *Ann Rev Biochem* **55**: 397-425
36. Jungerman M, Słomski R (1990) *Post Biochem* **36**: 14-21
37. Kohara Y, Akiyma K, Isono K (1987) *Cell* **50**: 495-508
38. Hulanicka D, Zatyka M, Sirko A, Sadowy E (1991) XV Congress of Biochemistry Abstract str 315
39. Hoopes BC, McClure WR (1987) W: Neidhardt FC (red) Escherichia coli and Salmonella typhimurium cellular and molecular biology, t 2. Washington DC, str 1231-1241
40. Ostrowski J, Kredich NM, (1990) *J Bacteriol* **172**: 779-785
41. Monroe RS, Ostrowski J, Hryniewicz M, Kredich NM (1990) *J Bacteriol* **172**: 6919-6929
42. Hryniewicz M, Kredich NM (1991) *J Bacteriol* in press

Electrophoresis Forum'92
Munich, Germany, 26—28 October 1992
Info: Professor B J Radola,
Technical University Munich,
W-8050 Freising-Weihenstephan, FRG.

http://rcin.org.pl

Gen DMD — największy gen człowieka

DMD gene — the largest human gene

JOLANTA KWIATKOWSKA[1]
RYSZARD SŁOMSKI[2]

Spis treści:

I. Wykrycie genu DMD
II. Struktura genu DMD
III. Struktura dystrofiny
IV. Ekspresja dystrofiny
V. Lokalizacja i funkcja dystrofiny w mięśniach szkieletowych
VI. Dystrofie mięśniowe Duchenne'a i Beckera
VII. Mutacje genu DMD
VIII. Korelacja objawów klinicznych ze zmianami w genotypie
IX. Diagnostyka molekularna
X. Uwagi końcowe

Contents:

I. Discovery of DMD gene
II. Structure of DMD gene
III. Structure of dystrophin
IV. Expression of dystrophin
V. Localisation and function of dystrophin in skeletal muscle
VI. Duchenne and Becker muscular dystrophies
VII. Mutations in the DMD gene
VIII. Correlation of clinical symptomes with changes in genotype
IX. Molecular diagnostics
X. Final remarks

Wykaz stosowanych skrótów: DMD — dystrofia mięśniowa Duchenne'a; BMD — dystrofia mięśniowa Beckera; CK — kinaza fosfokreatyny.

I. Wykrycie genu DMD

W 1861 i 1868 r. Duchenne opisał po raz pierwszy chorobę, nazwaną później dystrofią mięśniową Duchenne'a. Pierwsze doniesienia o chorobie były jak na ówczesne lata bardzo nowoczesne — zawierały dokładne opisy kliniczne uzupełnione wynikami badań z zakresu fizjologii i histologii mięśni [1, 2, 3]. Jeszcze na długo zanim prawa Mendla zostały uznane przez naukę zauważono, że choroba występuje jedynie u mężczyzn i przenoszona jest przez zdrowe kobiety. W 1955 r. Becker opisał alleliczną względem DMD, łagodniejszą postać dystrofii mięśniowej, opisaną jako BMD [4]. Przez wiele następnych lat starano się poznać przyczynę obydwu dystrofii. Jeszcze 10 lat temu jedyną potwierdzoną obserwacją było sprzężenie choroby z chromosomem X. U większości chorych w badaniach cytogenetycznych nie obserwowano jednak anomalii struktury chromosomu.

Rozwój nowych technik badawczych w ostatnich latach umożliwił bliższe poznanie molekularnego podłoża dystrofii. W 1986 r. zlokalizowano w prążku Xp21 w chromosomie X gen wywołujący dystrofię (gen DMD). Od tej pory rozwój wydarzeń potoczył się w błyskawicznym tempie. W okresie krótszym niż rok wyizolowano gen [5, 6], poznano strukturę cDNA i wykryto białkowy produkt genu, który nazwano dystrofiną [7, 8]. Okazało się, że gen DMD jest największym opisanym dotychczas genem u Eukaryota. Należy również do najlepiej poznanych genów człowieka. Nowe techniki badawcze opracowane do badania struktury genu DMD znajdują także zastosowanie do sekwencjonowania innych genów ludzkiego genomu, a także w rutynowej diagnostyce medycznej.

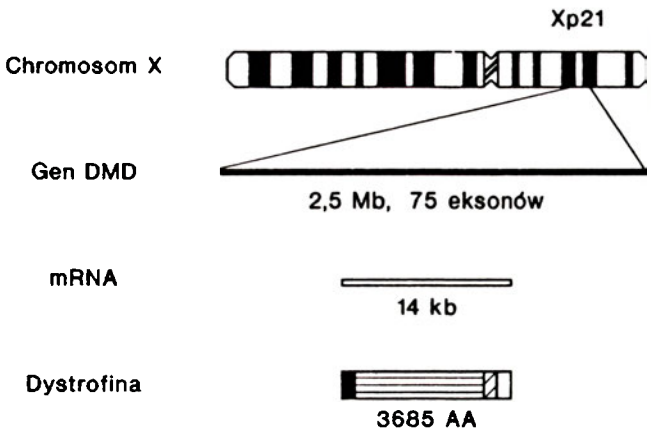
II. Struktura genu DMD

Dystrofia mięśniowa Duchenne'a jest pierwszą chorobą genetyczną człowieka, do badania której zastosowano z powodzeniem strategię badawczą określoną mianem odwrotnej genetyki (ang. *reverse genetics*). Określenie to mówi, że zmiany sekwencji nukleotydów w DNA prowadzące do wystąpienia choroby poznano bez jakichkolwiek wcześniejszych informacji o produkcie genu. Techniką elektroforezy w zmiennym polu wykazano, że gen DMD zawiera 2.5 miliona par zasad (2.5 Mbp), co stanowi ponad 1% DNA chromosomu X (0.001 genomu człowieka) [9]. Jest więc ponad 12 razy większy od olbrzymiego genu kodującego czynnik VIII krzepnięcia krwi. Liczba eksonów genu DMD nie jest dokładnie znana, ale przyjmuje się, że jest ich ponad 75 (Ryc. 1). Eksony przedzielone są intronami o średniej wielkości 35 kb [6, 10]. cDNA dystrofiny jest stosunkowo mały, złożony z 13973 nukleotydów, z czego pierwsze 11336 nukleotydów koduje białko, a reszta stanowi region nie ulegający translacji [11]. Z porównania sekwencji cDNA genu

[1] Mgr, [2] Prof. dr hab., Zakład Genetyki Człowieka PAN, ul. Strzeszyńska 32, 60-479 Poznań.

http://rcin.org.pl

dystrofiny z mięśni szkieletowych człowieka i cDNA z komórek mięśnia sercowego wynika, że sekwencje te są homologiczne w 88%, a sekwencje na poziomie aminokwasów w 86% [12].



Ryc. 1. Diagram przedstawiający chromosom X człowieka oraz lokalizację i wielkość genu DMD.

III. Struktura dystrofiny

Dystrofina kodowana przez gen DMD jest dużym białkiem, o masie 427 kDa zbudowanym z 3685 aminokwasów i jest białkiem mocno konserwatywnym, szczególnie na końcu karboksylowym. Dystrofina jest strukturalnie pokrewna grupie białek obejmującej α-aktyniny oraz α-i β-spektryny [8, 13]. Analizując sekwencję aminokwasów opisaną na podstawie zsekwencjonowanego cDNA dystrofiny Koenig i współautorzy [11] sugerują, że białko zawiera cztery domeny. N-terminalna domena złożona z 240 aminokwasów cechuje się wysoką homologią z α-aktyniną w części odpowiedzialnej za wiązanie aktyny [11, 14]. Druga, największa domena składająca się z 25 potrójnie helikalnych segmentów, obejmuje aminokwasy 278-3080 i jest podobna do powtarzających się segmentów α-aktyniny i spektryny [11, 15]. W 20-tu pierwszych eksonach granice ekson-intron odpowiadają krańcom powtarzających się segmentów, co sugeruje, że ewolucja białka obejmowała wielokrotne duplikacje. Trzecia domena obejmuje aminokwasy 3080-3360. Na 280 aminokwasów tego segmentu przypada 15 cystein. Domenę tę porównuje się z C-terminalną domeną α-aktyniny, zawierającą miejsca wiązania jonów Ca^{2+}. Ostatnia, C-terminalna domena, złożona z 420 aminokwasów, nie wykazuje podobieństwa do żadnego z poznanych białek.

IV. Ekspresja dystrofiny

Techniką *Northern blottingu* wykazano, że gen DMD ulega ekspresji w mięśniach szkieletowych płodów i osobników dorosłych, lecz nie stwierdzono ekspresji w komórkach fibroblastów skóry i komórkach zarodkowych [16, 17]. Dalsze badania wykazały ekspresje w hodowanych *in vitro* komórkach miogennych dopiero po wyróżnicowaniu się tych komórek [18]. W badaniach ekspresji tkankowo-specyficznej zastosowano bardzo czułą metodę enzymatycznej amplifikacji odcinków mRNA. Produkty reakcji uzyskano na matrycy mRNA z komórek mięśni szkieletowych, mięśnia sercowego, mięśni gładkich, a także, choć w mniejszych ilościach z mózgu, nerek, płuc, łożyska, wątroby, śledziony, hodowli fibroblastów i limfoblastów (Tabela 1). Celem zlokalizowania dystrofiny w poszczególnych tkankach centralnego układu nerwowego u zdrowych i dystroficznych myszy zastosowano metody immunocytochemiczne [20]. Okazało się, że najwięcej dystrofiny występuje w móżdzku, korze mózgowej i rdzeniu kręgowym. Brak dystrofiny w mięśniach szkieletowych prowadzi u człowieka i zwierząt do dystrofii mięśniowej [7, 21, 22].

Tabela 1.
Występowanie transkryptów genu DMD w tkankach człowieka

Tkanka	Zawartość transkryptów genu DMD w badanej tkance w % ich zawartości w mięśniach szkieletowych	Piśm.
Mięsień szkieletowy	100	16,19
Serce	80—100	16,19
Mięsień gładki	2—10	16
Nerka	1.6	16
Kora mózgu	1	16
Płuco	1	16
Wątroba	0.05	16
Łożysko	0.05	16
Śledziona	0.05	16
Fibroblasty (*in vitro*)	<0.05	16
Hepatoma (*in vitro*)	<0.05	16
Limfocyty (*in vitro*)	0.01	16
Limfocyty krwi	1 transkrypt/ 1000 komórek	50, 51, 52

V. Lokalizacja i funkcja dystrofiny w mięśniach szkieletowych

Hoffman i współautorzy [13] zastosowali cDNA dystrofiny myszy, (homologiczny względem dwóch różnych regionów genu DMD człowieka) do uzyskania poliklonalnych przeciwciał, które w analizie białek z mięśni szkieletowych metodą *Western blotting* rozpoznawały białka o masie cząsteczkowej około 400 kDa. Nie zaobserwowano sygnałów na filtrach zawierających białka pacjentów z dystrofią. Subkomórkowe frakcjonowanie komórek mięśniowych myszy wykazało, że dystrofina występuje razem z białkami kanału wapniowego, we frakcji z triadami. Triady są komponentami włókien mięśniowych, złożonymi z układu poprzecznych kanalików otaczających miofibrylle i będących wpukleniami sarkolemmy (tzw. kanaliki T)

http://rcin.org.pl

oraz terminalnych części cystern retikulum sarkoplazmatycznego. Do miejsca, gdzie znajdują się triady dochodzą z neuronów ruchowych sygnały depolaryzujące błonę, po czym następuje uwolnienie jonów wapniowych z retikulum sarkoplazmatycznego i skurcz mięśnia. Prawdopodobnie funkcja dystrofiny polega na zakotwiczaniu triad w cytoszkielecie miofibrylarnym [21].

Celem dokładnego poznania lokalizacji dystrofiny w komórkach mięśniowych zastosowano przeciwciała ze znacznikiem fluorescencyjnym [23, 24]. Na przekrojach podłużnych i poprzecznych preparatów mikroskopowych włókien mięśniowych zaobserwowano, że dystrofina występuje w sarkolemmie, w postaci cienkiej, nieprzerwanej warstwy. W preparatach pochodzących od pacjentów z DMD wynik był negatywny, a od pacjentów z BMD białko tworzyło przerywaną warstwę [24]. Uzyskane wyniki sugerują, że dystrofina pełni również funkcję białka strukturalnego w membranach włókien mięśniowych, a dystrofie typu Duchenne'a i Beckera są wynikiem niestabilności tych membran powodowanej niedoborem dystrofiny [13, 22, 23].

Pierwsze eksony mRNA dystrofiny mózgu i mięśni mają inne sekwencje nukleotydów co oznacza, że ekspresja jest regulowana przez inny promotor. Również na końcu 3′ transkryptu z mózgu stwierdzono alternatywny splicing, w wyniku którego powstają różne formy domeny karboksylowej. Dystrofina musi pełnić tu inną funkcję niż w mięśniach szkieletowych [25].

VI. Dystrofie mięśniowe Duchenne'a i Beckera

Dystrofie mięśniowe zaliczane są do najczęstszych chorób genetycznych. W oparciu o dane kliniczne i genetyczne wyodrębniono dystrofie sprzężone z chromosomem X (DMD, dystrofie Duchenn'a i BMD, Beckera oraz dystrofia Emery'ego-Dreifussa), dystrofie dziedziczone jako autosomalne cechy recesywne (np. dystrofia kończynowo-obręczowa) i jako autosomalne cechy dominujące (np. dystrofia twarzowo-łopatkowo-ramieniowa i dystrofia miotoniczna) [26]. DMD jest chorobą letalną, występującą z częstością 1:3500 noworodków płci męskiej i w 1/3 przypadków jest następstwem nowych, sporadycznych mutacji [27]. BMD występuje z ok. 10-krotnie mniejszą częstością.

Pierwsze objawy dystrofii Duchenne'a występują w wieku 3—5 lat i polegają głównie na trudnościach w chodzeniu z powodu dystrofii mięśni obręczy biodrowej. Zmiany postępują i przesuwają się do obręczy barkowej. Występuje przerost rzekomy głównie mięśni łydek, przykurcze mięśniowe, aż dochodzi do zaniku mięśni i ogólnego wyniszczenia. Zmiany dotyczą również mięśnia sercowego. Zgon następuje w drugiej lub trzeciej dekadzie życia.

Dystrofia mięśniowa typu Beckera polega na mniejszych ale identycznych jakościowo nieprawidłowościach jak w przypadku DMD. Pierwsze objawy kliniczne występują na ogół w drugiej dekadzie życia, następuje kolejno dystrofia mięśni kończyn dolnych, potem górnych, przerost rzekomy mięśni i w efekcie wczesne inwalidztwo. BMD w odróżnieniu od DMD nie jest letalna i chorzy mężczyźni w części przypadków są zdolni do wydania potomstwa.

Anomalie metaboliczne przejawiają się zwiększonym w surowicy poziomem enzymów mięśniowych (aldolazy, fosfokinazy kreatyny, transaminazy, dehydrogenazy mleczanowej). Parametrem diagnostycznym u chorych może być poziom fosfokinazy kreatyny w moczu i surowicy [27, 28]. Na podstawie stopnia zaawansowania choroby Gillard [29] opracował numeryczną skalę dystrofii: 1 — oznacza postać ciężką DMD; 2 — formę łagodniejszą DMD; 3 — formę pośrednią między DMD i BMD; 4 — ciężką postać BMD; 5 — łagodną postać BMD. Podkreśla się ostatnio potrzebę włączenia badań molekularnych i biochemicznych do diagnostyki klinicznej pacjentów z chorobami neuromięśniowymi. Dla przykładu wielu pacjentów z rdzeniowym zanikiem mięśni [30] lub dystrofią obręczowo-kończynową [31] okazało się po badaniach DNA, że są chorymi na BMD oraz, że niektórzy z pacjentów z diagnozą DMD mają chorobę autosomalną recesywną. Całkowicie swoistą cechą DMD/BMD jest niedobór dystrofiny w mięśniach szkieletowych i dlatego współczesna diagnostyka tych dystrofii powinna obejmować, oprócz badań klinicznych, także badania biochemiczne i molekularne.

VII. Mutacje genu DMD

Lokalizacja i sklonowanie genu DMD umożliwiły poznanie mutacji wywołujących chorobę. Przyczyniły się także do określenia nosicielstwa nieprawidłowego allelu u prawidłowych fenotypowo kobiet, pozwoliły również na prenatalne wykrywanie choroby. Jako mutacje najczęściej występujące w *locus* DMD/BMD stwierdzono delecje; stanowią one 60-65% wszystkich mutacji [6, 9, 29, 32, 33] i często obejmują duże fragmenty genu. Po raz pierwszy zostały wykryte przy użyciu sondy pERT87 [34] rozpoznającej region DXS164 genu i sondy XJ [35] z sąsiedniego regionu DXS206. Duplikacje w *locus* DMD/BMD wykazano u ok. 5% pacjentów; obejmują one zarówno sekwencje wewnątrzgenowe jak i położone w bezpośrednim sąsiedztwie genu. Pozostałe mutacje (ok. 30%) to prawdopodobnie mutacje punktowe. Zarówno delecje jak i duplikacje oraz mutacje punktowe prowadzą do zmian w strukturze dystrofiny i w rezultacie do zaburzeń funkcji tego białka.

Wykazano, że istnieją w genie DMD dwa regiony, w których najczęściej występują mutacje (ang. *hot spots*). W odległości 0,5 miliona par zasad od promotora, a więc w regionie DXS164/DXS206 i w części

http://rcin.org.pl

centralnej genu, tj. 1,2 miliona par zasad od promotora. U około 10% pacjentów wykazano delecje w pierwszym z wymienionych regionów [36, 37]. W centralnym regionie genu delecje pojawiają się częściej [6]. Częstość występowania delecji jest taka sama w DMD i BMD [32, 36].

Duplikacje w genie DMD po raz pierwszy opisał Bertelson i współautorzy [38]. Jak wiele innych mutacji w genie dystrofiny zostały one wykryte metodą *blottingu* wg Southerna i hybrydyzacji z sondą pERT87-15. Dalsze badania z użyciem klonów genomowego DNA i klonów cDNA wykazały, że duplikacje stanowią około 5% ogółu mutacji, a więc występują ok. 10 razy rzadziej niż delecje [29, 39].

DMD i BMD występują prawie wyłącznie u osób płci męskiej, opisano jednak nieliczne przypadki dystrofii u kobiet [40, 41]. Są one wynikiem translokacji między *locus* Xp21, a różnymi regionami chromosomów autosomalnych. Wszystkie przypadki są wynikiem mutacji *de novo*, nie stwierdzono zmian strukturalnych w materiale genetycznym krewnych pacjentek. Zadziwiający jest fakt, że pomimo występowania dwóch chromosonów X (prawidłowego i zmutowanego) inaktywacji ulega chromosom prawidłowy. Być może inaktywacja jest procesem rozprzestrzeniającym się od centrum inaktywacji na końcu długiego ramienia chromosomu X. Częściową ekspresję genu obserwuje się też niekiedy u nosicielek bez translokacji (ang. *manifesting carrier*).

VIII. Korelacja objawów klinicznych ze zmianami w genotypie

Z dotychczas opublikowanych prac wynika, że nie ma ścisłej korelacji między wielkością delecji lub duplikacji, a stopniem zaawansowania choroby [6, 33, 42]. Monaco i współautorzy [12] wysunęli hipotezę, że mutacje nie powodujące zmiany ramy odczytu prowadzą do łagodnej postaci dystrofii typu Beckera, a zmieniające ramę odczytu powodują letalną dystrofię typu Duchenne'a. Badania w innych ośrodkach potwierdziły słuszność tej hipotezy dla 92% przypadków [42]. Hipoteza Monaco nie sprawdza się jedynie w przypadku delekcji eksonów 3-7, w wyniku której zmieniona jest ramka odczytu i usunięta większość sekwencji domeny N-terminalnej, prowadząca do pośredniego stanu klinicznego między typem Beckera a Duchenne'a [43]. Również duże delecje obejmujące ponad 30 eksonów muszą prowadzić do DMD, gdyż powstające na tak zmienionej matrycy białko jest zbyt małe, aby pełnić prawidłową funkcję biologiczną. Hipoteza Monaco jednak znajduje potwierdzenie w 96% badanych przypadkach. Nie zmieniające ramki odczytu delecje eksonów 31-44 powodują łagodną postać BMD lub nawet przebiegają bezobjawowo [42]. Wiele delecji rozpoczyna się w obrębie intronu między eksonem 44 a 45. Prawdopodobnie wpływa na to olbrzymia wielkość tego intronu (ponad 200 kb). Opisano już kilkaset delecji rozpoczynających się w tym intronie, obejmujących fragmenty DNA o bardzo zróżnicowanej wielkości i prowadzących zarówno do łagodnej jak i ciężkiej postaci dystrofii.

IX. Diagnostyka molekularna

Współczesna diagnostyka chorób nerwowo-mięśniowych powinna uwzględniać wyniki badań klinicznych, biochemicznych i molekularnych. Pacjenci spełniający kryteria kliniczne dystrofii Duchenne'a lub Beckera i wykazujący podwyższony poziom kinazy fosfokreatyny poddawani są w wielu krajach już rutynowo nowoczesnej diagnostyce molekularnej. W naszym kraju badania molekularne wykonuje Zakład Genetyki Człowieka PAN (Poznań), Instytut Psychiatrii i Neurologii (Warszawa) i Centrum Zdrowia Dziecka (Warszawa). Materiałem do badań może być genomowy DNA wyizolowany z krwi obwodowej, z fibroblastów lub kosmków łożyska, a w przypadku diagnostyki prenatalnej z fibroblastów płodu. Podstawową metodą badawczą zmian strukturalnych genu dystrofiny była do niedawna hybrydyzacja genomowego DNA pacjentów z radioaktywnymi sondami molekularnymi. Pierwszymi sondami molekularnymi były sklonowane, naturalne fragmenty genu jak również fragmenty DNA flankujące gen. Po sklonowaniu cDNA, sondy cDNA znalazły natychmiast zastosowanie diagnostyczne i w zasadzie wyparły wcześniej stosowane sondy genomowe. Obecnie, w metodzie Southerna, po trawieniu genomowego DNA endonukleazą Hind III, stosuje się najczęściej pięć subklonów cDNA pokrywających cały region kodujący genu. Ze względu na olbrzymią wielkość genu DMD i różnorodność fragmentów restrykcyjnych analiza uzyskanych wyników jest skomplikowana.

Nowszą metodą wykrywania delecji jest amplifikacja *in vitro* (PCR) eksonów genu DMD. Zasady metody PCR zostały przedstawione czytelnikom *Postępów Biochemii* w artykule Jungerman i Słomskiego [44]. W badaniach genu DMD zastosowano po raz pierwszy wariant PCR (*multiplex*) umożliwiający jednoczesną amplifikację kilku eksonów. W pionierskiej pracy Chamberlaina i współautorów [45] reakcja *multiplex* obejmowała sześć eksonów, w regionach genu DMD, w których najczęściej występują delecje. Pojedynczą reakcją PCR można było wykryć ok. 60% wszystkich delecji. Nic dziwnego, że ta reakcja znalazła natychmiastowe zastosowanie w diagnostyce DMD i BMD. Wkrótce reakcją *multiplex* objęto jeszcze trzy eksony, a wykrywalność delecji wzrosła do 80% [46]. Ostatnio Beggs i współautorzy włączyli do reakcji *multiplex* jeszcze 9 eksonów i region promotora genu, zwiększając w ten sposób wykrywalność delecji do 98% [47]. Oryginalne doniesienia zakładały, że 19 fragmentów genu DMD można analizować w dwóch reakcjach PCR

http://rcin.org.pl

(Tabela 2). W praktyce diagnostycznej rozdział i ocena fragmentów o zbliżonej wielkości jest prawie niemożliwy, dlatego z reguły wykonuje się ok. 5 reakcji PCR. Autorzy niniejszego opracowania metodą PCR analizują 20 regionów genu DMD — region promotora i eksony 3, 4, 6, 8, 12, 13, 17, 19, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52 i 60, wykonując 6 reakcji typu *multiplex*.

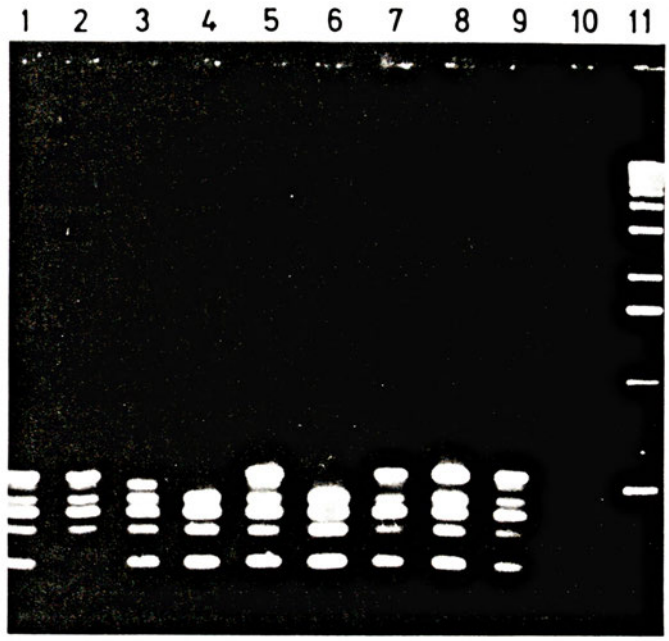
Tabela 2.
Wykrywanie delacji w genie DMD prowadzących do dystrofii mięśniowych typu Duchenne'a i Beckera z zastosowaniem metody PCR.

Autor metody	Eksony objęte reakcją PCR	Wykrywalność delecji	Piśm.
Chamberlain i wsp.	8, 17, 19, 44, 45, 48	70%	45
Chamberlain i wsp.	4, 8, 12, 17, 19, 44, 45, 48, 51	80%	46
Beggs i wsp.	Pm, 3, 4, 6, 8, 12, 13, 17, 19, 43, 44, 45, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 60	98%	47
Abbs i wsp.	Pm, 3, 4, 6, 8, 13, 19, 42, 43, 44, 45, 47, 48, 50, 51, 52, 53, 60	98%	56

Pm — promotor genu DMD.

Metoda PCR jest również stosowana do wykrywania nosicielstwa zmutowanego genu DMD w rodzinach z ryzykiem wystąpienia dystrofii. Wykorzystano tutaj naturalny polimorfizm regionu pERT genu DMD, oceniany poprzez trawienie uzyskanych produktów PCR endonukleazami Xmn I, Bam HI i Taq I [48].

Ukazały się ponadto doniesienia o wykrywaniu delecji i ustalaniu nosicielstwa dystrofii poprzez analizę mRNA limfocytów krwi obwodowej, z wykorzystaniem zjawiska nieuprawnionej transkrypcji (ang. *illegitimate transcription*) wykazanej po raz pierwszy przez Chelly'ego i współautorów [49]. Materiałem wyjściowym jest tu całkowity RNA limfocytów. Na matrycy RNA przeprowadza się syntezę cDNA stosując primery specyficzne dla genu DMD, a następnie dwie reakcje PCR z wewnętrznymi primerami (ang. *nested* PCR). Ukazało się już kilka doniesień o zastosowaniu tej metody nie tylko do analizy patologicznych transkryptów, lecz również do ustalania nosicielstwa dystrofii [50, 51, 52]. Szczególnie cenne jest bezpośrednie ustalanie nosicielstwa, gdyż próby ustalenia nosicielstwa metodą hybrydyzacji z subklonami cDNA, metodą PCR lub poprzez analizę sprzężeń nie dają informatywnych wyników w wielu przypadkach osób z rodzin z ryzykiem DMD. Pełna analiza molekularna powinna zawierać oprócz wyników bezpośredniego badania genu także wyniki badań produktu genu. Dystrofinę można obecnie oznaczać techniką immunoblottingu lub immunofluorescencji [53, 54, 55]. Badania zmierzają do uzyskania przeciwciał rozpoznających poszczególne domeny dystrofiny i mogą być stosowane zarówno w diagnostyce, jak i wykrywaniu nosicielstwa dystrofii.



Ryc. 2. Wykrywanie delecji genu DMD metodą PCR w wersji multiplex (58, 59). Rycina przedstawia rozdzielone elektroforetycznie w żelu agarozowym produkty reakcji, w której jednocześnie amplifikowano 6 eksonów (ekson 8, 17, 19, 44, 45, 48). Tor 1, zdrowa osoba (kontrola pozytywna); tor 2—9, chorzy na DMD; (u części pacjentów zauważalne delecje); tor 10, kontrola negatywna; tor 11, marker wielkości. Przeprowadzenie analizy 20 eksonów umożliwia wykrycie 98% delecji.

X. Uwagi końcowe

Poznanie struktury genu DMD i wyjaśnienie molekularnego podłoża dystrofii mięśniowych Duchnne'a i Beckera jest przykładem ogromnego postępu genetyki molekularnej w ostatnich latach. W okresie obejmującym zaledwie jeden rok, przy zastosowaniu odwrotnej genetyki poznano białkowy produkt największego genu człowieka. Wyjaśniono również podstawowe mechanizmy prowadzące do wystąpienia DMD i BMD. Poznawaniu genu DMD towarzyszyło olbrzymie zainteresowanie wielu renomowanych ośrodków naukowych. Zaowocowało to wprowadzeniem do nauki nowych metod badawczych — metody PCR w wersji *multiplex* i kompleksowej analizy mutacji poprzez cDNA-PCR. Również nieuprawniona transkrypcja została opisana po raz pierwszy na przykładzie tego genu. Badania genu DMD nie zostały jednak zakończone. Poszukiwane są mutacje punktowe, które, aż u 30% pacjentów, prowadzą do wystąpienia łagodnej lub złośliwej postaci dystrofii. Prowadzone są również badania DNA i dystrofiny mające na celu wyjaśnienie różnorodności postaci DMD i BMD [56]. Na ostatnim Zjeździe Europejskich Towarzystw Genetycznych w Leuven [Belgia, 1991] zagadnieniom dotyczącym DMD poświęcono wiele uwagi. Przed-

http://rcin.org.pl

stawiono również wstępne informacje o sklonowaniu całego genomowego DNA w sztucznym chromosomie drożdży oraz o kilku mutacjach punktowych.

Artykuł otrzymano 19 listopada 1991 r.
Zaakceptowano do druku 18 stycznia 1992 r.

* * *

Podziękowanie:
Autorzy dziękują Panu Prof. Jackowi Zarembie za pomoc w przygotowaniu pracy. R. S. dziękuje Fundacji Aleksandra von Humboldta za umożliwienie zebrania materiałów.

Piśmiennictwo

1. Duchenne GBA (1861) w: De l'electrisation localisee et son application a la pathologie et a la therapeutique (red Bailliere), Paris
2. Duchenne GBA (1868) *Arch Gen Med* **11**: 5.
3. Gewers WR (1879) w: Pseudo-hyperthropic muscular paralysis — A clinical lecture (red. Churchill J. i A.) London.
4. Becker PE, Kiener F (1955) *Arch Psychiatr Neurol* **193**: 427
5. Monaco AP, Kunkel LM (1988) w: Advances in Human Genetics (red. Harris H., Hirschorn K.) vol **17**: 1-41 Plenum Publishing, New York
6. Koenig M, Hoffman EP, Bertelson CJ, Monaco AP, Feener C, Kunkel LM (1987) *Cell* **50**: 509-517
7. Hoffman EP, Brown RH, Kunkel LM (1987) *Cell* **51**: 919-928
8. Hoffman EP, Fischbeck KH, Brown RH, Johnson M, Medori R, Loike JD, Harris JB, Waterson R, Brooke M, Specht L, Kupsky W, Chamberlain J, Caskey CT, Shapiro F, Kunkel LM (1988) *N Engl J Med* **318**: 1363-1368.
9. den Dunnen JT, Bakker R, Klein-Breteler EG, Pearson PL, von Ommen GJB (1987) *Nature* **329**: 640-642
10. van Ommen GJB, Bertelsen C, Ginjaar HB, den Dunnen JT, Bakker E, Chelly J, Matton M, van Essen AJ, Bartley J, Kunkel LM, Pearson PL (1987) *Genomics* **1**: 329-336
11. Koenig M, Monaco AP, Kunkel LM (1988) *Cell* **53**: 219-228
12. Monaco AP, Bertelson CJ, Liechti-Gallati S, Moser H, Kunkel LM (1988) *Genomics* **2**: 90-95
13 Hoffman EP, Monaco AP, Feener CC, Kunkel LM (1987) *Science* **238**: 347-350
14. Hammonds RGJr (1987) *Cell* **51**: 1
15. Davison MD, Critchley DR (1988) *Cell* **52**: 159-160
16. Monaco AP, Neve RL, Oletti-Feener C, Bartelson CJ, Kurnit DM, Kunkel LM (1986) *Nature* **323**: 646-650
17. Burghes AHM, Logan C, Hu X, Bellfal B, Worton RG, Ray PN (1987) *Nature* **328**: 434-437
18. Lev AA, Feener CC, Kunkel LM, Brown RB (1987) *J Biol Chem* **262**: 15817-15820
19. Chelly J, Kaplan JC, Maire P, Gautron S, Kahn A (1988) *Nature* **333**: 858-860
20. Lidov HGW, Byers TJ, Watkins SC, Kunkel LM (1990) *Nature* **348**: 725-727
21. Hoffman EP, Hudecki M, Rosenberg P, Pollina CM, Kunkel LM (1988) *Neutron* **1**: 411-420
22. Hoffman EP, Kunkel LM (1989) *Neuron* **2**: 1019-1029
23. Zubrzycka-Gaarn EE, Bulman DE, Karpati G, Burghes AHM, Belfall B (1988) *Nature* **333**: 466-469
24. Bonilla E, Samitt CE, Miranda AF, Hays AP, Salvati G, DiMauro S, Kunkel LM (1988) *Cell* **54**: 447-452
25. Feener CA, Koenig M, Kunkel LM (1989) *Nature* **338**: 509-511
26. Walton JN (1955) *Ann Hum Genet* **20**: 1
27. Moser H (1984) *Hun Genet* **66**: 17-40
28. Appel SH, Roses AD (1983) w: Metabolic basis of inherited disease (red. Stanbury JB), McGraw-Hill, New York, str 1470-1495
29. Gillard EF, Chamberlain JS, Murphy EG, Duff CL, Smith B, Burghes AHM, Thompson MW (1989) *Am J Hum Genet* **45**: 507-520
30. Lunt PW, Cumming WJ, Kingston H, Read AP, Mountford RC, Mahon M, Harris R (1989) *Lancet* **1**: 46-47
31. Norman A, Thomas N, Coakely J, Harper P (1989) *Lancet* **1**: 466-468
32. Forrest SM, Cross GS, Thomas NST, Harper PS, Smith TJ, Read AD, Mountford RC (1987) *Lancet* **2**: 1294-1297
33. Darras BT, Blattner P, Harper JF, Spiro AJ, Alter S, Francke U (1988) *Am J Hum Genet* **43**: 620-629
34. Monaco AP, Bertelson CJ, Middlesworth W, Colleti CA, Aldrige J, Fishbeck KH, Bartrlett R, Pericak-Vance MA, Roses AD, Kunkel LM (1985) *Nature* **316**: 842-845
35. Ray PN, Belfall B, Duff C, Logan C, Kean V, Thompson MW, Sylvester JE, Gorski JL, Schmickel RD, Worton RG (1985) *Nature* **318**: 672-675
36. Hart K, Cole C, Walker A, Hodgson S, Johnson L (1986) *J Med Genet* **23**: 516-520
37. Kunkel LM, Hejtmanclk JF, Caskey CT, Spear A, Monaco AP (1986) *Nature* **322**: 73-77
38. Bertelson CJ, Bartley JA, Monaco AP, Colletti-Feener C, Fischebeck K, Kunkel LM (1986) *J Med Genet* **23**: 531-537
39. Hu X, Burghes AHM, Bulman DE, Ray PN, Worton RG (1989) *Am J Hum Genet* **44**: 855-863
40. Boyd Y, Buckle V, Holt S, Munro E, Hunter D, Craig I (1986) *J Med Genet* **23**: 484-490
41. Boyd Y, Buckle VJ (1986) *Clin Genet* **29**: 108-115
42. Koenig M, Beggs AH, Moyer M, Scherpf S, Heinrich K, Bettecken T, Meng G, Miller CR, Lindlf M, Kaariainen H, Chapelle A, Kiuru A, Savontaus ML, Gilgenkrantz H, Recan D, Chelly J, Kaplan JC, Covone AE, Archidiacono N, Romeo G, Liechti-Gallati S, Schneider V, Braga S, Moser H, Darras BT, Murphy P, Francke U, Chen JD, Morgan G, Denton M, Greenberg CR, Wrogemann K, Blonden LAJ, v. Paassen HMB, v. Ommen GJB, Kunkel LM (1989) *Am J Hum Genet* **45**: 498-506
43. Malhotra SB, Hart Ka, Klamut HJ, Thomas NST, Bodrug SE, Burghes AHM, Bobrow M, Harper PS, Thompson MW, Ray PN, Worton RG (1988) *Science* **242**: 755—759
44. Jungerman M, Słomski R (1990) *Post Biochem* **36**: 14-21
45. Chamberlain JS, Gibbs RA, Ranier JE, Nguyen PN, Caskey CT (1988) *Nucleic Acids Res* **16**: 11141-11156
46. Chamberlain JS, Gibbs RA, Ranier JE, Caskey CT (1989) w: PCR protocols: a guide to methods and applications (red Innis M, Gelfand D, Sninski J, White E) Academic Press, Orlando, str 272-281
47. Beggs AH, Koenig M, Boyce FM, Kunkel LM (1990) *Hum Genet* **86**: 45-48
48. Roberts RG, ColeCG, Hart KA, Bobrow M, Bentley DR (1989) *Nucleic Acids Res* **17**: 2, 811
49. Chelly J, Concordet JP, Kaplan JC, Kahn A (1989) *Proc Natl Acad Sci USA* **86**: 2617-2621
50. Roberts RG, Bentley DR, Barby TFM, Manners E, Bobrow M (1990) *Lancet* **336**: 1523-1526
51. Schloesser M, Słomski R, Wagner M, Reiss J, Berg L-P, Kakker VV, Cooper DN (1990) *Mol Biol Med* **7**: 519-523
52. Roberts RG, Barby TFM, Manners E, Bobrow M, Bentley DR (1981) *Am J Hum Genet* **49**: 298-330
53. Arahata K, Hoffman EP, Kunkel LM, Ishiura S, Tsukahara T, Ishihara T, Sunohara N (1989) *Proc Natl Acad Sci USA* **86**: 7154-7158

http://rcin.org.pl

54. Arahata K, Ishihara T, Kamakura K, Tsukahara T, Ishiura S, Baba C, Matsumoto T, Nonaka I, Sugita H (1989) *N Engl J Med* **320**: 138-142
55. Hoffman EP, Kunkel LM, Angelini C, Clarke A, Johnson M, Harris JB (1989) *Neurology* **39**: 1011-1017
56. Abbs S, Yau SC, Clarc S, Mathew CG, Bobrow M (1991) *J Med Genet* **28**: 304-311
57. Beggs AH, Hoffman EP, Snyder JR, Arahata F, Specht L, Shapiro F, Angelini C, Sugita H, Kunkel LM (1991) *Am J Hum Genet* **49**: 54-67
58. Słomski R, Reiss J, Jungerman M (1989) *Acta Biochim Polon* **36**: 311-321
59. Hentemann M, Reiss J, Wagner M, Cooper DN (1990) *Hun Genet* **84**: 228-232

Enzymy naprawiające DNA: UvrABC-endonukleza *Escherichia coli*

DNA repair enzymes: UvrABC-endonuclease of *Escherichia coli*

CELINA JANION[1]

Spis treści:

I Specyficzność naprawy DNA
II Rola poszczególnych białek
III Genetyka i ekspresja białek
IV Metabolizm białka UvrB
V Preferencyjna naprawa DNA

Contents:

I Specyficity of DNA repair
II Role of the proteins
III Genetics and expression of the proteins
IV Metabolism of the UvrB protein
V Preferential DNA repair

Wykaz stosowanych skrótów: UvrA, UvrB, UvrC, LexA, OmpT, Ada — są to nazwy białek kodowanych przez geny *uvrA*, *uvrB*, *uvrC*, *lexA*, *ompT*, *ada*; IPTG — tiogalaktopyranozyd izopropylu; System SOS — indukcyjny system komórkowy obejmujący w *E. coli* około 20 genów, których ekspresja zachodzi gdy, na skutek zbyt licznych uszkodzeń DNA, synteza DNA zostaje zahamowana.

I. Specyficzność naprawy DNA

Ostatnie lata przyniosły wiele nowych danych na temat działania UvrABC-endonukleazy, enzymu znanego głównie z usuwania dimerów pirymidynowych z DNA. Przede wszystkim okazało się, że specyficzność substratowa enzymu, zakres uszkodzeń usuwanych z DNA jest o wiele szerszy niż początkowo przypuszczano. Utarło się przekonanie, że UvrABC-endonukleaza usuwa fragmenty DNA zawierające tak zwane "*bulky adducts*", zmodyfikowane zasady o znacznie zwiększonej objętości, powodujące zaburzenia i zagięcia struktury DNA o 30—50°. Takimi uszkodzeniami są dimery i 6-4 fotoprodukty pirymidynowe powstające pod wpływem promieniowania UV265nm [1—3], mono i di-addukty różnych pochodnych psoralenu powstające pod wpływem promieni UVA365nm [4], addukty cis-plytyny [5], benzo(a)pyrenu [6] i wielu innych związków. Okazało się jednak, że UvrABC-endonukleaza usuwa uszkodzenia, które nieznacznie lub wcale nie zmieniają struktury DNA, jak np. miejsca pozbawione zasad i glikol-tyminy [7] lub 0^6metyloguanina [8]. Szybkość naprawy usuwanych uszkodzeń jest różna. I tak na przykład fotoaddukty psoralenu usuwane są z 5-krotnie większą szybkością niż dimery pirymidynowe, a dimery pirymidynowe z 5-krotnie większą szybkością niż 0^6metyloguanina [8].

II. Rola poszczególnych białek

Aktywność UvrABC-endonukleazy jest wynikiem współdziałania trzech różnych białek o całkowicie odrębnej roli. Uszkodzenie któregokolwiek z genów kodujących te białka powoduje zanik aktywności endonukleolitycznej. Białko UvrA, jako jedyne z pośród nich, ma zdolność do wiązania się z dwuniciowym DNA [9, 10]. W jego składzie aminokwasowym znajdują się sekwencje wskazujące na istnienie dwóch palców cynkowych — struktur ułatwiających interakcje z kwasami nukleinowymi [11, 12]. Czy te struktury pomagają przy wiązaniu białka UvrA z DNA nie zostało ustalone.

Białko UvrA w komórkach *E. coli* występuje głównie w formie dimeru $UvrA_2$. Dimeryzacja zachodzi po przyłączeniu się do białka ATP [13, 14]. Przy czym

[1] Prof. dr hab., Instytut Biochemii i Biofizyki PAN, 02-532 Warszawa, ul. Rakowiecka 36.

http://rcin.org.pl

ATP nie ulega defosforylacji, chociaż białko UvrA ma słabe właściwości ATPazy, a także GTPazy [10]. Dimer $UvrA_2$ wiąże się z białkiem UvrB w kompleks $UvrA_2B$ przed lub po przyłączeniu się do DNA. Kompleks $UvrA_2B$, w porównaniu z białkiem $UvrA_2$, wykazuje znacznie zwiększoną aktywność ATPazy [15]. Białko UvrB ma w swej strukturze motyw spotykany w białkach o aktywności ATPazy, jednak natywne białko UvrB aktywności ATPazy nie wykazuje [16, 17].

Wytworzony kompleks $UvrA_2B$ po przyłączeniu się i rozluźnieniu struktury DNA przemieszcza się wzdłuż osi DNA w kierunku 5′ — 3′ (aktywność translokazy, lub helikazy [18, 19]), czerpiąc energię z rozkładu ATP lub dATP. Po dotarciu do miejsca uszkodzenia $UvrA_2B$ umieszcza się naprzeciw nici wymagającej naprawy, wtedy przyłącza się białko UvrC i przecina wiązania fosfodiestrowe w dwóch miejscach: wiązanie 8-me w kierunku 5′ i wiązanie 4-te lub 5-te w kierunku 3′, licząc od zasady uszkodzonej [20]. Wycięciu ulega więc 12 lub 13 nukleotydowy odcinek DNA bez względu na rodzaj uszkodzenia [21]. Powstała luka ulega wypełnieniu w wyniku działania polimerazy DNAI i nowosyntetyzowany fragment zostaje związany z DNA działaniem ligazy.

Proces naprawy DNA zawierającego di-addukty psoralenu, który wiąże jednocześnie obie nici DNA, albo związki interkalujące w sferę obydwu nici DNA, jest bardziej złożony i wymaga procesów rekombinacji z udziałem białka RecA [22, 23].

Po wycięciu uszkodzonego fragmentu DNA białka nie ulegają oddysocjowaniu. Oddysocjowanie i obrót białek następuje w obecności helikazy II i DNA polimerazy I [24—26].

Aktywność UvrABC-endonukleazy wycinającej dimery pirymidynowe wzrasta około 5-krotnie w obecności fotoliazy, enzymu, który przy udziale światła widzianego odwraca proces dimeryzacji i rozbija dimery pirymidynowe z utworzeniem zasad wyjściowych [27]. W warunkach gdy monodimeryzacja nie zachodzi enzym, poprzez przyłączenie się do dimeru, zwiększa prawdopodobnie powinowactwo białek $UvrA_2B$ do wiązania się z DNA.

Orren i Sancar [14] uważają, że rolą białka UvrA jest przeniesienie UvrB do miejsca uszkodzenia, natomiast proces wycinania zachodzi przy udziale białek UvrB i UvrC. Zaznaczają to w nazewnictwie enzymu przez umieszczenie A w nawiasie: Uvr(A)BC-endonukleaza (właściwie, używają nazwy (A)BC-ekscinukleaza, którą nie wszyscy akceptują [28]). Istotnie w badaniach *in vitro* obserwuje się aktywność nukleolityczną już w obecności dwóch białek UvrB i UvrC. Grossman uważa jednak, że jest to proces niespecyficzny. Gdy substratem jest natywne DNA, wycięciu ulega fragment 9-cio nukleotydowy, a stężenie białek UvrB i UvrC wymaganych do tej reakcji znacznie przekracza stężenie białek występujących w warunkach fizjologicznych [29].

Z badań nad ochroną DNA przed trawieniem DNazą I wynika, że białko UvrA ochrania przed nukleolizą fragment o wielkości 33 par zasad, natomiast po dodaniu białka UvrB powierzchnia ochraniana maleje do 19 nukleotydów [30]. Może być to wynikiem zarówno oddysocjowania białka UvrA, jak i zmiany konformacyjnej białek po wytworzeniu kompleksu $UvrA_2B$. Wytworzony kompleks $UvrA_2B$-uszkodzone DNA jest bardzo trwały. Okres półtrwania wynosi w/g Younga i współautorów 42 minuty [31] w/g Orrena i Sancara 100 minut [14].

III. Genetyka i ekspresja białek

Geny *uvrA*, *uvrB*, *uvrC* kodujące poszczególne białka są rozmieszczone w różnych miejscach chromosomu bakteryjnego, a mianowicie na 92, 18, i 42 minucie mapy genetycznej *E. coli* [32]. Geny te zostały sklonowane, zsekwencjonowane, a białka przez nie kodowane oczyszczone do homogenności [33—39]. Ciężar cząsteczkowy białek wynosi (w kDa) 103, 870 (UvrA) 78, 116 (UvrB) i 66, 038, lub 68, 510 (UvrC). Przez dłuższy czas sądzono, że ekspresja tych trzech genów jest regulowana wspólnie, supresorem jest białko LexA, a ekspresja zachodzi po indukcji systemu SOS. System SOS obejmuje wspólną regulacją około 20 genów. Ich indukcja jest następstwem wypadków zachodzących po uszkodzeniu i zahamowaniu syntezy DNA. Promienie UV i wiele innych czynników powodują indukcję regulonu SOS [40]. Tymczasem okazało się, że tylko ekspresja genów *uvrA* i *uvrB* zachodzi po indukcji SOS, natomiast ekspresja genu i synteza białka UvrC przebiega w sposób konstytutywny [41 — 44]. Ponadto okazało się, że gen *uvrB* ma dwa czynne promotory, z których tylko jeden jest represorowany przez białko LexA [42]. Rejon regulatorowy genu *uvrC* jest jeszcze bardziej skomplikowany, występują w nim trzy promotory chociaż transkrypcja tylko z jednego z nich pozwala na normalną naprawę uszkodzeń indukowanych ultrafioletem [45]. Zależnie od tego, z którego promotora zachodzi transkrypcja, białko UvrC składa się z 588 lub 610 aminokwasów. W komórce bakteryjnej w stanie podstawowym znajduje się około 25 cząstek białka UvrA, 250 — UvrB i 10 do 20 cząstek białka UvrC. Po indukcji systemu SOS ilość białek na komórkę zwiększa się do 250 w przypadku białka UvrA i do 1000 w przypadku białka UvrB [46 — 47].

IV. Metabolizm białka UvrB

W czasie izolowania z ekstraktów *E. coli* białko UvrB łatwo ulega hydrolizie do krótszego o 40 aminokwasów białka UvrB* [35, 48, 49]. Okazało się, że jest to wynik działania OmpT-proteazy, enzymu związanego z błoną komórkową, który bierze również udział w obróbce białka Ada — białka o dwóch funkcjach enzymatycznych i jednocześnie regulatora regulonu "*the adaptive response*" [50]. Ciekawy jest fakt, że

http://rcin.org.pl

ekspresja genu *ompT* wzrasta 5—7-krotnie po indukcji termicznej [49]. Białko OmpT należy więc do rodziny białek szoku termicznego [51]. Szczep *E. coli* ze skonstruowanym genem *uvrB*, którego transkrypcja zależy od promotora faga lambda P_L blokowanego ciepłochwiejnym represorem C_I—hodowany w temperaturze 42° gromadzi w dużych ilościach głównie białko UvrB* [34].

Białko UvrB* w odróżnieniu od UvrB ma aktywność ATPazy i chociaż łączy się z białkiem UvrA w kompleks $UvrA_2B^*$, kompleks ten nie wykazuje aktywności helikazy i nie jest aktywny w reakcji naprawy DNA. Być może proces proteolizy UvrB stanowi sposób na szybką inaktywację nadmiaru UvrABC endonukleazy, który może być dla komórki szkodliwy [48, 49].

V. Preferencyjna naprawa DNA

Preferencyjną naprawę DNA zauważono w komórkach chomika chińskiego [52], badając szybkość naprawy dimerów pirymidynowych w DNA uszkodzonym przez UV. Naprawa DNA poprzez wycięcie fragmentu uszkodzonego zachodzi w sposób podobny w komórkach eukariotycznych (drożdże — ssaki — komórki ludzkie), jak i prokariotycznych (bakterie), chociaż białka biorące udział w tym procesie u Eukaryota są o wiele mniej znane niż u *E. coli*. Bohr i współautorzy [52] badając kinetykę naprawy DNA w komórkach jajników chomika zauważyli, że geny aktywne są naprawiane o wiele szybciej niż geny milczące. Podczas gdy w aktywnie transkrybowanym genie DHFR (gen kodujący reduktazę dihydrofolianową) o wielkości 1400 par zasad 70% uszkodzeń zostało naprawione, to w pozostałej masie DNA proces naprawy obejmował tylko 10 — 20% uszkodzeń. Dalsze badania prowadzone na tej samej tkance, jak i na komórkach ludzkich ujawniły, że istnieje preferencja w stosunku do naprawianej nici aktywnego genu: nicią intensywnie naprawianą w genie DHFR była nić transkrybowana [53]. Ten kierunek badań jest intensywnie rozwijany, a obiektem badań są głównie tkanki organizmów wyższych [54—57]: Przyczym zwraca się uwagę nie tylko na preferencje w naprawie DNA, ale i na preferencje w mutagenezie. Szybsza naprawa uszkodzeń w nici transkrybowanej powoduje, że mutacje będą zachodzić częściej na nici nietranskrybowanej [58].

Preferencyjną naprawę u *E. coli* wykazano w sposób jednoznaczny poprzez porównanie szybkości zanikania dimerów pirymidynowych z ogólnej masy DNA oraz z DNA operonu *lac* będącego bądź w stanie represji, bądź w stanie transkrypcji [59]. Okazało się, że naprawa DNA milczącego operonu *lac*, pozostałej masy DNA i nici nietranskrybowanej operonu *lac* będącego w stanie ekspresji — przebiega z jednakową szybkością. Natomiast, transkrybowana nić naprawiana jest z szybkością 5—7-krotnie wyższą.

Na pytanie w jaki sposób transkrypcja może kierować naprawą DNA próbują odpowiedzieć Selby i Sancar, badając te dwa procesy w układach *in vitro* przy użyciu oczyszczonych białek UvrABC, polimerazy RNA i innych czynników wymaganych do ekspresji genów i naprawy DNA [60, 61]. Do badań używano dwóch substratów: syntetycznego, liniowego fragmentu DNA o długości 137-par zasad, który zawierał w nici transkrybowanej, lub w nici nietranskrybowanej pojedynczy dimer tyminy — oraz plazmidu pBR3274 (pochodna pBR328) stosowanego jako wektora trzech genów: *umuC* transkrybowanego z promotora *tac*, słabo ulegającego ekspresji genu *amp* i bezpromotorowego genu *cam*. DNA plazmidowe uszkadzane było przez naświetlanie UV254nm, przez dodanie pochodnej psoralenu i naświetlanie UVA365nm oraz przez dodanie cisplatyny. Poprzez użycie represora (białko LacI) lub induktora (IPTG) operonu *lac* autorzy mogli swobodnie wpływać na stan ekspresji genu.

Badania te wykazały, że obecność dimeru na nietranskrybowanej (kodującej) nici DNA nie wpływa na proces transkrypcji, natomiast obecność dimeru na transkrybowanej (matrycowej) nici DNA powoduje zatrzymanie się transkrypcji w miejscu występowania dimeru i utworzenie stałego kompleksu elongacyjnego. Efektem tego jest proces odwrotny od spodziewanego: nić transkrybowana naprawiana była wolniej [60]. Preferencyjną naprawę transkrybowanej nici DNA, której intensywność zależała od poziomu transkrypcji genu, przywracał dopiero izolowany z ekstraktów *E. coli* czynnik białkowy o wielkości 40—120 kDa [61].

W jaki sposób ten czynnik może kierować naprawą DNA nie jest wiadomo. Przypisywane mu są dwie role: 1. kierowanie naprawy do nici, która ulega transkrypcji i 2. przeciwdziałanie sterycznej przeszkodzie, jaką stanowi dla naprawy DNA unieruchomiona w procesie transkrypcji polimeraza RNA [61]. Można jednak przypuszczać, że białko spełnia tylko rolę podaną w punkcie 2. Być może, że samo zatrzymanie procesu transkrypcji (poprzez zmiany elektrostatyczne czy zaburzenia struktury DNA) przyciąga białka naprawy do uszkodzonego miejsca. Jednak naprawa, zgodnie z naszą wiedzą zachodzi na dwuniciowym DNA. Możliwe jest więc, że rolą czynnika białkowego jest odciąganie polimerazy RNA z miejsca transkrypcji. Powoduje to czasowe zamknięcie oczka transkrypcyjnego i umożliwia naprawę nici uszkodzonej. Tak więc samo zatrzymanie procesu transkrypcji wskazuje na miejsce naprawy, a oddysocjowanie RNA polimerazy jest konieczne, aby mogło nastąpić wycięcie fragmentu i odbudowanie struktury pierwotnej DNA. Nie byłabym zdziwiona, gdyby — czynnikiem białkowym przywracającym preferencyjną naprawę DNA — okazało się być białko DnaK ochraniające RNA polimerazę przed denaturacją [61], lub inne białko z rodziny białek szoku termicznego znanych ze swych funkcji opiekuńczych [62].

Artykuł otrzymano 28 stycznia 1992 r.
Zaakceptowano do druku 18 lutego 1992 r.

http://rcin.org.pl

Piśmiennictwo

1. Setlow RB, Carrer WL (1964) *Proc Natl Acad Sci USA* **51**: 226-231
2. Boyce RP, Howard-Flanders P (1964) *Proc Natl Acad Sci USA* **51**: 293-300
3. Franklin W, Haseltine WA (1984) *Proc Natl Acad Sci USA* **81**: 3821-3824
4. Sancar A, Franklin KA, Sancar G, Tang M (1985) *J Mol Biol* **184**: 725-734
5. Beck DJ, Popoff S, Sancar A, Rupp DW (1985) *Nucleic Acids Res* **18**: 7395-7412
6. Seeberg E, Steinum AL, Nordenskjold M, Soderhall S, Jernstrom B (1983) *Mutat Res* **112**: 139-145
7. Lin JJ, Sancar A (1989) *Biochem* **28**: 7979-7984
8. Voigt JM, Van Houten B, Sancar A, Topal M (1989) *J Biol Chem* **264**: 5172-5176
9. Kaciński BM, Rupp WD (1982) *Nature* **294**: 480-481
10. Seeberg E, Steinum A (1982) *Proc Natl Acad Sci USA* **79**: 988-992
11. Doolittle RF, Johnson MS, Husain I, Van Houten B, Thomas DC, Sancar A (1986) *Nature* **323**: 451-453
12. Navaratnam S, Myles GM, Strange RS, Sancar A (1989) *J Biol Chem* **264**: 16067-16071
13. Orren DK, Sancar A (1989) *Proc Natl Acad Sci USA* **86**: 5237-5241
14. Mazur S, Grossman L (1991) *Biochemistry* **30**: 4432-4443
15. Oh EY, Claassen L, Thiagalingam S, Mazur S, Grossman L (1989) *Nucleic Acids Res* **17**: 4145-4159
16. Arrikan E, Kulkarni MS, Thomas DC, Sancar A (1986) *Nucleic Acids Res* **14**: 2637-2650
17. Backendorf C, Spaink H, Barbiero AP, van de Putte P (1986) *Nucleic Acids Res* **14**: 2877-2890
18. Oh EY, Grossman L (1987) *Proc Natl Acad Sci* **84**: 3638-3642
19. Oh EY, Grossman L (1989) *J Biol Chem* **264**: 1336-1343
20. Sancar A, Rupp DW (1983) *Cell* **33**: 249-260
21. Van Houten B, Gamper H, Halbrook SR, Hearst JE, Sancar A (1988) *J Biol Chem* **263**: 16553-16560
22. Lin PF, Bardwell E, Howard-Flanders P (1977) *Proc Natl Acad Sci USA* **74**: 291-295
23. Van Houten B, Gamper H, Holbrook SR, Hearst JE, Sancar A (1986) *Proc Natl Acad Sci USA* **83**: 8077-8081
24. Caron PR, Kushner SR, Grossman L (1985) *Proc Natl Acad Sci USA* **82**: 4925-4929
25. Husain I, Van Houten B, Thomas DC, Abdel-Monem M, Sancar A (1985) *Proc Natl Acad Sci USA* **82**: 6774-6778
26. Kumura K, Sekiguchi M, Steinum AL, Seeberg E (1985) *Nucleic Acids Res* **13**: 1483-1492
27. Sancar A, Franklin KA, Sancar GB (1984) *Proc Natl Acad Sci USA* **81**: 7397-7401
28. Grossman L, Yeung AT (1990) *Mutat Res* **236**: 213-221
29. Caron PR Grossman L (1988) *Nucleic Acids Res* **16**: 7855-7863
30. Van Houten B, Gamper H, Sancar A, Hearst JE (1987) *J Biol Chem* **262**: 13180-13187
31. Yeung AT Matters WB, Grossman L (1986) *Nucleic Acids Res* **14**: 2567-2582
32. Bachmann BJ (1990) *Microbiol Rev* **54**: 130-197
33. Yoakum GH, Grossman L (1981) *Nature* **292**: 171-173
34. Yeung AT, Mattes WB, Oh EY, Grossman L (1982) *Nucleic Acids Res* **14**: 8535-8556
35. Thomas DC, Levy M, Sancar A (1983) *J Mol Biol* **260**: 9875-9883
36. Yoakum GH, Yeung AT, Mattes WB, Grossman L (1983) *Proc Natl Acad Sci USA* **79**: 1766-1770
37. Sancar GB, Sancar A, Rupp WD (1984) *Nucleic Acids Res* **12**: 4593-4608
38. Arikan E, Kulkarni MS, Thomas DC, Sancar A (1986) *Nucleic Acids Res* **14**: 2637-2650
39. Backendorff C, Spaink H, Barbeiro AP, van de Putte P (1986) *Nucleic Acids Res* **14**: 2877-2890
40. Walker GC (1984) *Microbiol Rev* **48**: 60-93
41. Sancar A, Sancar GB, Little JW, Mount DW, Rupp WD (1982) *Nature* **298**: 96-98
42. Sancar GB, Sancar A, Little JW, Rupp WP (1982) *Cell* **28**: 523-530
43. Forster J, Strike P (1985) *Gene* **35**: 71-82
44. Bertrand-Burggraf E, Hurstel S, Daune M, Schnarr M (1987) *J Mol Biol* **193**: 293-302
45. Moolenaar GF, van Sluis CA, Backendorf C, van de Putte P (1987) *Nucleic Acids Res* **15**: 4273-4288
46. Markham BE, Harper JE, Mount DW, Sancar GB, Sancar A, Rupp WD, Kenyon CJ, Walker GC (1984) *J Mol Biol* **178**: 237-248
47. Selby CP, Sancar A (1990) *Mutat Res* **236**: 203-211
48. Caron PR, Grossman L (1988) *Nucleic Acids Res* **16**: 9651-9662
49. Caron PR, Grossman L (1988) *Nucleic Acids Res* **16**: 10903-10912
50. Shevell DE, Friedman BM, Walker GC (1990) *Mutat Res* **233**: 53-72
51. Lipińska B (1990) *Post Biochem* **36**: 32-42
52. Bohr VA, Smith CA, Okumoto DS, Hanawalt PC (1985) *Cell* **40**: 359-369
53. Mellon I, Spivak G, Hanawalt PC (1987) *Cell* **51**: 241-249
54. Hanawalt PC (1991) *Mutat Res* **247**: 203-211
55. Bohr VA (1991) *Carcinogenesis* **12**: 1983-1992
56. Terleth C, van de Putte P, Brouwer J (1991) *Mutagenesis* **6**: 103-111
57. Leadon SA, Lawrence DA (1991) *Mutat Res* **255**: 67-78
58. Mc Gregor WG, Chen R-H, Lukash L, Maher VM, Mc Cormick JJ (1991) *Mol Cell Biol* **11**: 1927-1934
59. Mellon I, Hanawalt PC (1989) *Nature* **342**: 95-98
60. Selby CP, Sancar A (1990) *J Biol Chem* **265**: 21330-21336
61. Selby CP, Sancar A (1991) *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 8232-8236
62. Skowyra D, Georgopoulos C, Żylicz M (1990) *Cell* **62**: 939-944
63. Hightower LE (1991) *Cell* **66**: 191-197

Do członków Polskiego Towarzystwa Biochemicznego

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

http://rcin.org.pl

System SOS: Mutagenna odpowiedź komórki na uszkodzenia DNA

SOS system: Mutagenic responce to DNA damage

ELŻBIETA GRZESIUK [1]

Spis treści:

I. Wstęp
II. System SOS i jego regulacja
III. Wielofunkcyjne białko RecA
IV. Operon *umuDC*
IV. 1. Identyfikacja genów *umuD* i *umuC*
IV. 2. *mucA* i *mucB* plazmidowe analogi *umuD* i *umuC*
IV. 3. Białka UmuD i UmuC — wzajemne oddziaływanie
V. Mutageneza SOS
VI. Uwagi końcowe

Contents:

I. Introduction
II. SOS system and its regulation
III. Multifunctional RecA protein
IV. *umuDC* operon
IV. 1. Identification of *umuD* and *umuC* genes
IV. 2. *mucA* and *mucB* the plasmids analogs of *umuD* and *umuC*
IV. 3. UmuD and UmuC proteins and their interactions
V. SOS mutagenesis
VI. Conclusions

Wykaz stosowanych skrótów: *recA*, *lexA*, *umuDC*, *mucAB* — geny regulonu SOS; RecA, LexA, UmuDC, MucAB — białka kodowane przez te geny; system SOS-regulon SOS — zespół genów regulowanych przez białka RecA-LexA, indukowanych w odpowiedzi na uszkodzenie DNA.

I. Wstęp

W odpowiedzi na działanie czynników uszkadzających DNA, lub interferujących z jego replikacją, w komórce bakteryjnej dochodzi do ekspresji szeregu genów, których produkty biorą udział w takich procesach jak naprawa DNA, rekombinacja i mutageneza. Pomimo, że geny te są zlokalizowane w różnych miejscach chromosomu bakteryjnego jednak podlegają wspólnej regulacji. Taki układ genów objętych wspólną regulacją określa się mianem regulonu. Ponieważ ekspresja wspomnianych genów jest odpowiedzią komórki na działanie czynników zagrażających jej życiu, to zespół tych genów nazwano regulonem SOS lub systemem SOS [1, 2]. W wyniku działania czynników indukujących system SOS dochodzi do powstawania mutacji. Zjawisko to określa się mianem mutagenezy SOS.

Negatywnym regulatorem systemu SOS jest białko represorowe LexA, produkt genu *lexA*. Białko LexA wiążąc się z sekwencją promotorową genów SOS zapobiega ich ekspresji. Jednakże promotory takich genów jak: *uvrA*, *uvrB*, i *recA* wiążą represor LexA na tyle słabo, że nawet w niezaindukowanej komórce poziom białek kodowanych przez te geny jest dość wysoki.

W indukcji genów SOS główną rolę odgrywa białko RecA. Pod wpływem działania czynników uszkadzających DNA w komórce gromadzi się dużo jednoniciowego DNA, który w obecności ATP powoduje aktywację białka RecA. Takie aktywne białko powoduje proteolityczny rozpad represora, co w konsekwencji prowadzi do derepresji genów regulonu SOS.

Przykładem uszkodzenia indukującego system SOS są dimery tyminy, które tworzą się w DNA po naświetlaniu komórki promieniami UV. Dimer tyminy nie może utworzyć pary z żadną zasadą i wobec tego replikacja DNA ulega zahamowaniu. Dopiero indukcja systemu SOS umożliwia dalszą syntezę DNA. Mutacja powstająca zwykle w miejscu uszkodzenia DNA jest ceną, jaką płaci komórka za kontynuację replikacji, a tym samym za przeżycie.

Jedną z największych zagadek mutagenezy SOS jest rola operonu *umuDC*. Indukcja dwóch genów wchodzących w skład tego operonu: *umuD* i *umuC* jest konieczna dla wydajnej mutagenezy. Mutacje *umuD* lub *umuC* blokują mutagenezę SOS lecz jedynie w niewielkim stopniu wpływają na przeżywalność komórek po działaniu różnych mutagenów.

Sekwencje chromosomalne podobne do *umu* znaleziono jedynie u kilku gatunków bakteryjnych. Udało się jednak zidentyfikować pozachromosomalne *loci* kodujące funkcje *umu*-podobne w przynajmniej dziesięciu plazmidach [3]. Określono sekwencję dwóch *loci*: *mucAB* i *impAB* [2, 3]. Okazało się, że geny te są regulowane przez RecA i LexA, ich DNA wykazuje 35 do 50% homologii z *umuDC*, a białka przez nie kodowane są podobnej do UmuDC wielkości. Obecność *mucAB* lub *impAB* w mutantach *umuDC E. coli* powoduje przywrócenie mutabilności.

W artykule zostanie omówiona rola genów *recA*,

[1] Dr, Instytut Biochemii i Biofizyki PAN, 02-532 Warszawa, ul. Rakowiecka 36.

http://rcin.org.pl

umuD i *umuC* w mutagenezie SOS, a także mechanizm powstawania mutacji indukowanych działaniem UV i niektórych czynników chemicznych.

II. System SOS i jego regulacja

W regulacji odpowiedzi SOS kluczową rolę odgrywają dwa geny: *recA* i *lexA*. Gen *lexA* koduje białko LexA będące represorem genów regulonu SOS. Wiążąc się z sekwencjami operatorowymi znajdującymi się na początku każdego genu, białko LexA blokuje również ekspresję genów *recA* i *lexA*. Niektóre geny, takie jak *recA* mają pojedyncze miejsce operatorowe wiążące LexA, podczas gdy inne, jak *lexA* i *umuDC* mają po dwa operatory.

Sygnał indukcyjny wywołany uszkodzeniem DNA powoduje przekształcenie białka RecA w formę aktywną RecA* o właściwościach proteazy. RecA* przecina białko LexA w pobliżu środka cząsteczki pomiędzy Ala 84 i Gly 85 [4]. Dwa proteolityczne fragmenty nie spełniają już roli represora, co prowadzi do wyrażenia genów SOS (w tym genu *recA*) na wysokim poziomie [1]. Z chwilą gdy komórka uwalnia się spod działania sygnału indukcyjnego dzięki temu, że uszkodzone DNA zostało naprawione, cząsteczki RecA* powracają do stanu podstawowego. Wobec braku aktywności proteolitycznej RecA, a jednocześnie dzięki ciągłej syntezie LexA, pula białka LexA powiększa się. Prowadzi to do wiązania LexA z operatorami genów SOS, a więc ich represji i powrotu komórki do stanu wyjściowego.

Izolowano szereg mutantów, które fenotypowo wykazują konstytutywne lub podwyższone wyrażenie odpowiedzi SOS (Tabela 2). Wszystkie dotychczas znalezione mutacje powodują nieprawidłowości w metabolizmie DNA lub replikacji.

Tabela 1
Geny regulonu SOS

Gen	Lokalizacja na mapie chromosomu (min)	Produkt genu lub funkcja
lexA	92	Represor SOS
recA	58	Rekombinacja, cięcie represora LexA oraz białka UmuD, mutageneza SOS, i inne
umuD, C	26	Mutageneza SOS
sulA (sfiA)	22	Inhibitor podziałów komórkowych
uvrA	92	Naprawa DNA
uvrB	18	Naprawa DNA
uvrD	85	Helikaza II, rekombinacja zależna od RecF, naprawa DNA, replikacja DNA
ruv	41	Rekombinacja zależna od białka RecF
recN	58	Rekombinacja zależna od białka RecF
recQ	85	Rekombinacja zależna od białka RecF
himA	37	Miejscowo swoista rekombinacja
dinA (polB)	2	Polimeraza II DNA
dinB	8	Nieznany
dinD	80—85	Nieznany
dinF	92	Nieznany
mucA, B (na plazmidzie pKM101)		Mutageneza SOS

Tabela 2
Lista genów, których uszkodzenie ułatwia lub prowadzi do indukcji regulonu SOS.

Gen	Kodowane białko	Funkcja białka
dam	Metylaza adeninowa DNA	Metylacja adeniny w DNA do 6-metyloadeniny w sekwencji 5'-GATC-3'
dnaB	Helikaza DnaB	Inicjacja replikacji DNA
dnaE	Podjednostka α polimerazy III DNA	Replikacja DNA
dnaG	Primaza	Inicjacja replikacji DNA
lig	Ligaza DNA	Ligacja fragmentów DNA
polA	Polimeraza I DNA	Replikacja DNA, naprawa DNA
recF	Nieznane	Szlak rekombinacyjny RecF i naprawa DNA
ruv	Nieznane	Szlak rekombinacyjny RecF i naprawa DNA
ssb	Białko wiążące jednoniciowe DNA	Replikacja DNA, rekombinacja
uvrD	Helikaza II DNA	Replikacja DNA, naprawa źle dopasowanych zasad, naprawa przez wycinanie, szlak rekombinacyjny RecF i naprawa DNA

http://rcin.org.pl

III. Wielofunkcyjne białko RecA

Białko RecA odgrywa fundamentalną rolę w ogólnej rekombinacji oraz regulacji i wyrażeniu odpowiedzi SOS. W roku 1965 Clark i Margulies [5] opisali po raz pierwszy mutanta *recA E. coli* niezdolnego do rekombinacji. W dziesięć lat później Gudas i Pardee [6] opublikowali pierwszy model regulacji SOS, w którym główną rolę przypisali „białku X". W roku 1977 stosując najnowsze metody biologii molekularnej trzy laboratoria niezależnie wykazały, że „białko X" to białko RecA [7, 8, 9].

Jak już wspomniano białko RecA musi być zaktywowane aby zapoczątkować cięcie innych białek. Na podstawie doświadczeń przeprowadzonych *in vitro* Sassanfar i Roberts [10] stwierdzili, że nieodzownym warunkiem aktywacji białka RecA jest obecność w komórce jednopasmowego DNA (ssDNA) i trójfosforanu nukleozydowego (NTP). Wobec tego, że zarówno RecA jak i NTP są obecne w komórkach niezależnie od tego czy system SOS jest indukowany czy nie, to kandydatem do roli sygnału indukcyjnego pozostaje ssDNA. Aktywacja RecA (i następująca po niej indukcja SOS) jest spowodowana w pierwszym rzędzie przez współdziałanie RecA z ssDNA, lub z uszkodzonym dwupasmowym DNA (dsDNA). Reakcja cięcia kierowana przez aktywne białko RecA wymaga dodatkowo niezidentyfikowanego kofaktora mononukleotydowego, którym może być ATP lub dATP [10].

Warto w tym miejscu zaznaczyć, że chociaż białko RecA pośredniczy w cięciu represora LexA, jak również białka UmuD, to RecA nie jest proteazą. Każde z wymienionych białek zawiera autodestrukcyjną domenę, w której jedno z wiązań jest szczególnie labilne i w pH alkalicznym podlega hydrolizie. Tak więc RecA* katalizuje jedynie reaktywność tych homologicznych domen [11].

Działanie białka RecA jako regulatora jest dobrze poznane. Białko to ułatwia cięcie LexA — represora genów SOS doprowadzając do indukcji odpowiedzi SOS, oraz białka UmuD, co jest niezbędnym warunkiem zajścia mutagenezy.

Wydaje się, że są dwie możliwe drogi wznowienia replikacji w miejscu uszkodzenia DNA: replikacja poprzez uszkodzenie (ang. *translesion replication*) i ponowny start replikacji (ang. *replication restart*). Replikacja poprzez uszkodzenie jest odpowiedzialna za powstawanie mutacji w miejscu uszkodzenia DNA i stanowi uboczny szlak wznowienia replikacji. Główną drogą jest natomiast nie pozostawiający błędów ponowny start replikacji. Obie drogi wymagają uczestnictwa białka RecA, ale replikacja poprzez uszkodzenie dodatkowo zależy od białek UmuDC [12]. Sweasy i współautorzy [13] uważają, że oprócz roli regulatorowej białko RecA bierze również bezpośredni udział w replikacji poprzez uszkodzenie.

IV. Operon *umuDC*

W 1977 r. Kato i Shinoura [14] i niezależnie Steinborn [15] opisali mutacje, których obecność powodowała brak zdolności komórek *E. coli* do mutagenizacji przez 1-oksydo-4-nitrochinolinę i promieniowanie UV. Mutacje te zmapowano w nowym *locus* na 25 minucie mapy *E. coli* i nazwano *umuC* (od ang. *UV nonmutable*). Wkrótce okazało się, że w miejscu tym znajdują się dwa przylegające do siebie geny *umuD* i *umuC* [16].

Szczepy zawierające mutacje *umuD* lub *umuC* nie ulegają mutacji nie tylko przez UV i 1-oksydo-4-nitrochinolinę, ale również przez inne czynniki, np. sulfonian metanometylowy (MMS) [17], czy neokarcynostatynę [18]. Są jednakże takie czynniki chemiczne, jak N-metylo-N'-nitro-N-nitrozoguanidyna (MNNG) i sulfonian etylometanowy (EMS), które indukują mutagenezę w mutantach umuDC. Uszkodzenia DNA wywołane przez wymienione mutageny wynikają z nieprawidłowego parowania zasad, co nie wymaga wyrażenia odpowiedzi SOS aby pojawiła się mutacja [19].

IV. 1. Identyfikacja genów *umuD* i *umuC*

Elledge i Walker [20] sklonowali geny z *locus umuC E. coli* na niskokopiowym plazmidzie pSE101. Zidentyfikowali oni region 2.2kb kodujący dwa białka: 16000 oraz 45000 i wykazali, że oba te białka są wymagane do zajścia mutagenezy UV. Nieco później Kitagawa i współautorzy [21] zsekwencjonowali fragment DNA PstI/PstI o wielkości 2.8kb i udowodnili, że na tym fragmencie znajdują się dwa geny *umuD* i *umuC* tworzące dwucistronowy operon, w którym gen *umuD* zlokalizowany jest przed genem *umuC*. Końcowa adenina kodonu UGA, który jest kodonem stop genu *umuD* jest jednocześnie pierwszą zasadą kodonu inicjacyjnego AUG genu *umuC*. U prokariotów wiele, jeśli nie wszystkie regiony intercistronowe wykazują ścisłe połączenie, właśnie takie jak *umuD* i *umuC* i często spotyka się opinię, że ta niezwykła bliskość obu sygnałów odgrywa znaczącą rolę regulatorową w wyrażeniu operonu. Jednakże takie zachodzenie na siebie genów niekoniecznie łączy się z wydajną translacją. Okazało się, że w komórkach *E. coli* naświetlanych UV powstaje około 30 razy więcej UmuD niż UmuC [22]. Nie wiadomo jaki jest mechanizm regulacji powodujący taką zróżnicowaną syntezę produktów obu genów.

Transkrypcja operonu *umuDC in vitro* jest specyficznie hamowana przez białko LexA. LexA wiąże się do regionu operatorowego *umuD*, co wykazano określając rejon chroniony przez LexA przed trawieniem DNazą I [21]. Silne powinowactwo represora LexA do regionu operatorowego *umuD* zapobiega mutagenezie w niezaindukowanych komórkach.

http://rcin.org.pl

IV. 2. *mucA* i *mucB* plazmidowe analogi *umuD* i *umuC*

Plazmid pKM101 jest 34.5 kb DNA pochodzącym z plazmidu R46, który zwiększa wrażliwość *E. coli* i *Salmonella typhimurium* na mutagenezę wywołaną przez różne czynniki chemiczne, a także UV [23]. Izolowano mutanty insercyjne Tn5 plazmidu pKM101, które utraciły zdolność do mutagenezy i naprawy DNA [24]. Mapowanie insercji Tn5 doprowadziło do identyfikacji fragmentu wielkości około 2kb określonego jako *muc* (mutagenesis: UV and chemical), który był odpowiedzialny za wzrost wrażliwości komórek na mutagenezę i oporność na UV. Analiza *locus muc* wykazała, że składa się on z dwóch genów: *mucA* i *mucB* i że *locus mucAB* jest bardzo podobny do kodowanego przez chromosom *locus umuDC*. Gen *mucA* koduje białko 16000, a *mucB* 45000. Te dwa geny są zorganizowane w operon, w którym gen *mucA* jest położony przed genem *mucB*, a cały operon jest represorowany przez białko LexA [22]. Sekwencja aminokwasowa białek UmuD i MucA jest homologiczna z końcem -COOH represora LexA, jak również represorów bakteriofagów λ, 434 i P22 [25].

IV. 3. Białka UmuD i UmuC — wzajemne oddziaływanie

Badania genetyczne wykazały, że aby spełnić swoją rolę w mutagenezie białko UmuD musi być przecięte, a powstały fragment karboksylowy UmuD′ jest zarówno konieczny, jak i wystarczający, do spełnienia tej roli [26]. Proteolityczne cięcie białka UmuD zapoczątkowane przez aktywne białko RecA* zachodzi w wiązaniu Cys-Gly (pozycja 24-25) przy końcu -COOH cząsteczki.

Aby po naświetlaniu komórek promieniami UV powstały mutacje konieczne jest fizyczne współdziałanie UmuD (lub jego pochodnych) z UmuC. Kompleks formowany przez UmuC i UmuD′ wykazuje dużą trwałość. Białko UmuC jako wysoce zasadowe ułatwia wiązanie kompleksu UmuC-UmuD′ z DNA. Współdziałanie UmuC-UmuD′ z uszkodzeniem w DNA może hamować proces replikacji. Zakłada się, że do przejścia replikacji przez miejsce uszkodzenia konieczne jest białko UmuD′. Kompleks inicjacyjny zawierający nieprzetworzone białko UmuD może być szkodliwy dla komórki ponieważ nadprodukcja białek UmuDC inhibuje replikację DNA [27]. Zjawisko cięcia UmuD przez RecA* jest dużo bardziej skomplikowane jeśli porównać je do przypadku represora LexA czy represorów fagowych. Cięcie tych ostatnich zainicjowane przez RecA* prowadzi do utraty przez nie aktywności biologicznej, odwrotnie niż białko UmuD, które musi być przecięte, aby było aktywne w mutagenezie. Rola białka UmuD′ nie jest dokładnie poznana. Niejasne są też kolejne etapy procesu mutagenezy następujące po reakcji cięcia UmuD. Wiadomo jednak, że jedną z pierwszych jest reakcja dimeryzacji cząstek UmuD′ [28, 29] i wiązanie z UmuC [28, 30].

Battista i współautorzy [29] wysuwają hipotezę, że białko UmuD nie jest po prostu nieaktywną formą UmuD′ lecz inhibitorem mutagenezy. Autorzy twierdzą, że gdy na skutek naprawy DNA odpowiedź SOS zaczyna być wyłączana, białko UmuD akumuluje się w komórce i tworzy heterodimery z aktywną formą UmuD′. Związane z UmuD białko UmuD′ nie spełnia swego zadania, a więc można uznać, że UmuD jest dobrym kandydatem do roli negatywnego regulatora.

V. Mutageneza SOS

Mutageneza spowodowana przez UV i niektóre czynniki chemiczne jest procesem wymagającym interwencji systemu komórkowego, który przekształca uszkodzone DNA w sposób prowadzący do powstania mutacji. Do zajścia mutagenezy wymagane są produkty trzech genów: *recA*, *umuD* i *umuC*.

Znakomita większość mutacji zależnych od SOS powstaje w miejscach uszkodzenia DNA. Ponieważ w tych samych miejscach replikacja DNA zatrzymuje się wysunięto hipotezę, że białka SOS współdziałają z aparatem replikacyjnym, a w szczególności z polimerazą III DNA [31]. Bridges i współautorzy [32] sugerują dwustopniowy mechanizm mutagenezy UV. W pierwszym etapie (ang. *misincorporation*) dochodzi do wbudowania nieprawidłowej zasady naprzeciwko uszkodzenia w matrycowym DNA. Drugi etap (ang. *bypass*) wymaga indukcyjnego poziomu białek UmuDC [14] i zezwala na replikację DNA poza miejsce uszkodzenia. Szereg spostrzeżeń eksperymentalnych wskazuje, że polimeraza III DNA bierze udział w mutagenezie SOS [32, 33].

Od dość dawna wysuwa się hipotezę, że kiedy polimerazy DNA replikują uszkodzone matryce, ich zdolność do usuwania nieprawidłowych zasad z DNA musi być zablokowana aby zapobiec „utknięciu" kompleksu replikacyjnego w miejscu uszkodzenia [34]. I rzeczywiście okazało się, że oczyszczone białko RecA (w doświadczeniu *in vitro*) inhibuje aktywność 3′->5′ egzonukleazy podjednostki epsilon (ε) polimerazy III DNA. Funkcjonalny kompleks polimerazy III DNA *E. coli* jest zbudowany z co najmniej siedmiu białek [35]. Podstawowym zadaniem tego kompleksu jest duplikacja genomu bakteryjnego przy zachowaniu wysokiej wierności replikacji [36]. Podjednostka ε polimerazy III DNA kodowana przez gen *dnaQ* [37] zapewnia wierność replikacji poprzez pełnienie funkcji edytorskiej polegającej na usuwaniu z nowosyntetyzowanego pasma DNA zasady, która tworzy nieprawidłową parę z zasadą matrycowego pasma DNA. Interakcja ε z inną podjednostką polimerazy III DNA — podjednostką α kodowaną przez gen *dnaE* prowadzi do 10-80 krotnego podwyższenia aktywności 3′->5′ egzonukleazy [37]. W pewnych warunkach do-

http://rcin.org.pl

chodzi do deficytu ε w komórce i w konsekwencji do obniżenia wierności replikacji. Dzieje się tak wówczas, gdy na skutek uszkodzenia zmienia się struktura DNA. Wyniki uzyskane przez Jonczyka i współautorów [38] wyraźnie sugerują, że utrata zdolności edytorskiej przez podjednostkę ε odgrywa krytyczną rolę w powstawaniu mutacji podczas odpowiedzi SOS. Nadprodukcja ε uzyskana dzięki wprowadzeniu do komórki wielokopiowego plazmidu zawierającego gen *dnaQ* powoduje dramatyczne obniżenie mutagenezy [31, 38]. Foster i współautorzy [31] uważają, że nadprodukcja ε blokuje mutagenezę interferując z etapem „bypass". Blok ten może być usunięty dzięki wiązaniu ε przez inne białko indukowane w systemie SOS. Dobrym kandydatem są białka UmuDC, które jak wiadomo również biorą udział w drugim etapie mutagenezy.

Obecnie uważa się, że na jednym z początkowych etapów mutagenezy holoenzym polimerazy III DNA zatrzymuje replikację DNA w miejscu uszkodzenia (np. przy dimerze pirymidyny). Polimeraza może zatrzymać się z dwóch powodów: po pierwsze jeśli nie rozpoznaje wystarczająco wydajnie zasad nadających się do wbudowania gdyż nie zezwala na to nieprawidłowa matryca, a po drugie nawet prawidłowo wbudowana zasada może być odczytana jako źle sparowana przez aktywność edytorską 3'→5' egzonukleazy. Autorzy uważają, że replikacyjne ominięcie defektu w DNA zależy od tworzenia struktury nukleoproteinowej w miejscu uszkodzenia, tzw mutasomu. Proponuje się [39] następujący mechanizm tworzenia mutasomu. Cząsteczki RecA opłaszczają DNA w miejscu uszkodzenia tworząc filamenty. Związanie z DNA powoduje aktywację RecA co zapoczątkowuje cięcie LexA i prowadzi do syntezy UmuD i UmuC; następnie dochodzi do przekształcania UmuD w aktywny fragment UmuD'. W miejscu uszkodzenia DNA wiąże się mutasom, w skład którego wchodzi UmuC, UmuD', RecA i holoenzym polimerazy III DNA. Być może podczas indukcji SOS dochodzi do interakcji UmuDC z PolIII, a skutkiem tego współdziałania jest oddysocjowanie podjednostki ε co powoduje obniżenie wierności replikacji i pozwala na jej kontynuację (Cieśla, Z., inf. ustna).

VI. Uwagi końcowe

Szlak mutagenezy SOS zależy od dwóch reakcji regulatorowych: indukowanej syntezy UmuC i UmuD oraz przetworzenia UmuD do aktywnej formy UmuD'. Najnowsze badania dostarczyły dowodów na współdziałanie systemu SOS z białkami szoku termicznego, syntetyzowanymi w komórce gdy temperatura wzrośnie ponad wartość fizjologiczną. Pierwszym sygnałem uczestnictwa tych białek w odpowiedzi SOS była obserwacja, że określone mutacje w genach szoku termicznego znoszą zimnowrażliwość (niezdolność do wzrostu w 30°C) komórek nadprodukujących białka UmuDC [27].

Dwa geny *groE*: *groES* i *groEL* znajdują się w grupie 20 genów szoku termicznego *E. coli*, których synteza jest indukowana w wysokiej temperaturze przez produkt genu *rpoH* [40]. Donelly i Walker [41] stwierdzili, że mutanty *groE* nie są podatne na mutagenezę indukowaną UV, z czego wynika, że GroES i Gro EL są potrzebne aby mogły powstawać mutacje po naświetlaniu UV. Autorzy ci wykazali, że mutacje w genach *groES* i *groEL* powodują niestabilność białka UmuC nie wpływając na UmuD. Spostrzeżenie to sugeruje, że białka GroE pochodzące ze szczepu dzikiego są zdolne do fizycznego osłaniania UmuC przed proteolizą. Istnieje też możliwość, że białka te poprzez regulację aktywności proteazy mają pośredni wpływ na stabilność UmuC [41].

W mutagenezie indukowanej UV ilość białek UmuDC wydaje się być czynnikiem limitującym. Fakt, że nadprodukcja UmuDC z wysokokopiowego plazmidu powoduje przywrócenie mutagenezy UV w mutantach *groES* i *groEL* potwierdzają tą obserwację. Odpowiedni poziom UmuDC komórka naświetlana UV może uzyskać poprzez indukowaną ekspresję genów *umuDC* lub przez wyrażenie genów *groE*, co prowadzi do podwyższenia stabilności UmuC.

Nieomal każdy miesiąc przynosi nowe dane wyjaśniające jakiś aspekt mechanizmu mutagenezy SOS. Ciągle jednak nie jest jasna sekwencja zdarzeń w miejscu uszkodzenia DNA, jak też nie wiadomo jakie są wzajemne relacje pomiędzy białkami uczestniczącymi w mutagenezie SOS.

Artykuł otrzymano 28 stycznia 1992 r.
Zaakceptowano do druku 9 kwietnia 1992 r.

Piśmiennictwo

1. Walker GC (1984) *Microbiol Rev* **48**: 60-93
2. Peterson KR, Ossana N, Thliveris AT, Ennis DG, Mount DW (1988) *J Bacteriol* **170**: 1-4
3. Strike P, Lodwick D (1987) *J Cell Sci* **61**: (suppl) 303-321
4. Little JW (1983) *J Mol Biol* **167**: 791-808
5. Clark AJ, Margulies AD (1965) *Proc Natl Acad Sci USA* **53**: 451-459
6. Gudas LJ, Pardee AB (1975) *Proc Natl Acad Sci USA* **72**: 2330-2334
7. McEntee K (1977) *Proc Natl Acad Sci USA* **74**: 5275-5279
8. Gudas LJ, Mount DW (1977) *Proc Natl Acad Sci USA* **74**: 5280-5284
9. Emmerson PT, West SC (1977) *Mol Gen Genet* **155**: 77-85
10. Sassanfar M, Roberts JW (1990) *J Mol Bioll* **212**: 79-96
11. Echols H, Goodman MF (1991) *Ann Rev Biochem* **60**: 477-511
12. Echols H, Goodman MF (1990) *Mutat Res* **236**: 301-311
13. Sweasy JB, Witkin EM, Sinha N, Roegner-Maniscalo V (1990) *J Bacteriol* **172**: 3030-3036
14. Kato T, Shinoura Y (1977) *Mol Gen Genet* **156**: 121-131
15. Steinborn G (1978) *Mol Gen Genet* **165**: 87-93
16. Dimpfl J, Echols H (1989) *Genetics* **123**: 255-260
17. Walker GC, Elledge SJ, Kenyon CJ, Krueger JH, Perry KL (1982) *Biochemie* **64**: 607-610
18. Eisenstadt E, Wolf M, Goldberg IH (1980) *J Bacteriol* **144**: 656-660
19. Kato T, Ise T, Shinagawa H (1982) *Biochimie* **64**: 731-733

http://rcin.org.pl

20. Elledge SJ, Walker GC (1983) *J Mol Biol* **164**: 175-192
21. Kitagawa Y, Akaboshi E, Shinagawa H, Horii T, Ogawa H, Kato Y (1985) *Proc Natl Acad Sci USA* **82**: 4336-4340
22. Elledge SJ, Walker GC (1983) *J Bacteriol* **155**: 1306-1315
23. Chernin LS, Mikoyan VS (1981) *Plasmid* **6**: 119-140
24. Mortelmans KE, Stocker BAD (1979) *Mol Gen Genet* **167**: 317-328
25. Sauer RT, Yocum RR, Doolittle RF, Levis M, Pabo CO (1982) *Nature* **298**: 447-451
26. Nohmi T, Battista JR, Dodson LA, Walker GC (1988) *Proc Natl Acad Sci USA* **85**: 1816-1820
27. Marsh L, Walker GC (1985) *J Bacteriol* **163**: 376-384
28. Woodgate R, Rajogolan M, Lu C, Echols H (1989) *Proc Natl Acad Sci USA* **86**: 7301-7305
29. Battista JR, Ohta T, Nohmi T, Sun W, Walker GC (1990) *Proc Natl Acad Sci USA* **87**: 7190-7194
30. Perry KL, Elledge SJ, Walker GC (1985) *Proc Natl Acad Sci USA* **82**: 4331-4335
31. Foster PL, Sullivan AD, Franklin SB (1989) *J Bacteriol* **171**: 3144-3151
32. Bridges BA, Woodgate R (1985) *Proc Natl Acad Sci USA* **82**: 4193-4197
33. Hagenesee ME, Timme TL, Bryan SK, Moses RE (1987) *Proc Natl Acad Sci USA* **84**: 4195-4199
34. Villani G, Bouteux S, Radman M (1975) *Proc Natl Acad Sci USA* **78**: 3037-3041
35. Mc Henry CS, Kornberg A (1977) *J Biol Chem* **252**: 6478-6484
36. Mc Henry CS (1988) *Ann Rev Biochem* **57**: 519-550
37. Maki H, Kornberg A (1987) *Proc Natl Acad Sci USA* **84**: 4389-4392
38. Jonczyk P, Fijałkowska I, Cieśla Z (1988) *Proc Natl Acad Sci USA* **85**: 9124-9127
39. Lu C, Echols H (1987) *J Mol Biol* **196**: 497-504
40. Linquist S, Craig E (1988) *Ann Rev Genet* **22**: 631-677
41. Donelly CE, Walker GC (1989) *J Bacteriol* **171**: 6117-6125

Rybozymy — katalityczne cząsteczki RNA

Ribozymes — catalytical RNA molecules

ANNA MARIA CHACHULSKA [1]

Spis treści:

I. Wstęp
II. Typy rybozymów
III. Struktury rybozymów
IV. Mechanizmy reakcji
V. Inne aktywności rybozymów
VI. Rybozymy w terapii genowej
VII. Nowe poglądy na ewolucję

Contents:

I. Introduction
II. Types of ribozymes
II. Structures of ribozymes
IV. Mechanisms of reactions
V. Other activities of ribozymes
VI. Ribozymes in gene therapy
VII. New views on evolution

Wykaz stosowanych skrótów: IGS — *internal guide sequence*; EBS — *exon binding sequence*; IBS — *intron binding sequence*; K_m — stała Michaelisa-Menten; k_{cat} — liczba obrotów; *sTRSV* — satelitarny RNA wirusa plamistości tytoniu; *HDV* — wirus delta żółtaczki.

[1] mgr, Zakład Biosyntezy Białka, Instytut Biochemii i Biofizyki PAN, ul. Rakowiecka 36, 02-532 Warszawa.

I. Wstęp

Zdolność cząsteczek RNA do działania w roli biologicznego katalizatora została stwierdzona po raz pierwszy w 1982 roku przez Cecha i jego współpracowników, którzy wykazali, że intron genu 26S rRNA *Tetrahymena thermophila* samodzielnie wycina się z pre-rRNA po przyjęciu aktywnej konformacji [1]. W następnych latach wiedza na temat katalitycznej aktywności RNA ulegała szybkiemu wzbogaceniu. W 1983 roku wykazano, że aktywnym, katalitycznym składnikiem RNazy P jest RNA [2]. Dziś znanych jest już kilka odrębnych klas enzymów rybonukleinowych tzw. rybozymów i wysuwane są hipotezy na temat katalitycznej aktywności wielu innych cząsteczek RNA. O znaczeniu tych odkryć niech świadczy fakt, że pionierzy prac nad rybozymami, T. Cech i S. Altman, otrzymali w 1989 roku nagrodę Nobla w dziedzinie chemii.

Katalityczny RNA, podobnie jak białka enzymatyczne, ma zdolność zwiększania szybkości reakcji chemicznej, wykazuje specyficzność wobec substratu i produktu, który tworzy. Reakcja katalizowana przez rybozym zachodzi bez zużycia energii pochodzącej np.

http://rcin.org.pl

z ATP, wymagane jest jedynie odpowiednie stężenie jonów dwudodatnich (najczęściej Mg^{2+} lub Mn^{2+}).

II. Typy rybozymów

Najwcześniej wykryte rybozymy są intronami zdolnymi do samodzielnego wycinania się z pre-RNA (*self-splicing ribozymes*). Introny te są zróżnicowane pod względem budowy i mechanizmu reakcji. Jedne z nich to introny określane jako grupa I, do której zaliczono prawie 70 intronów mitochondrialnych genów grzybów niższych, jądrowych genów rRNA pierwotniaków, chloroplastowych genów tRNA roślin wyższych, chloroplastowych genów mRNA i rRNA *Chlamydomonas* oraz genów mRNA bakteriofagów T4 i SPO1. Przedstawicielem tej właśnie grupy jest pierwszy poznany rybozym — intron genu 26S rRNA *Tetrahymena thermophila* [3]. Do grupy II zaliczanych jest około 70 intronów pochodzących z genów mitochondrialnych grzybów niższych i roślin, a także z genów chloroplastowych roślin i pierwotniaków [4]. W większości przypadków nie wykazano zachodzenia samowycinania intronu *in vitro*. Introny te zalicza się do rybozymów tylko na podstawie homologii sekwencji.

Mniej liczne są wykryte kilka lat później tzw. rybozymy samotnące (*self-cleaving ribozymes*), autokatalitycznie tnące się na monomery. Tym mianem określa się małe, potogenne, jednoniciowe RNA roślinne i zwierzęce. Są to: wiroid skazy słonecznej avocado (*ASBV*), satelitarny RNA wirusa pierścieniowatej plamistości tytoniu (*sTRSV*), cztery wirusoidy towarzyszące wirusom roślinnym, transkrypt satelitarnego DNA 2 traszki *Nophtalemus viridescens* i RNA wirusa żółtaczki delta (*HDV*) towarzyszącego wirusowi żółtaczki B [5]. Cięcie wymienionych cząsteczek związane jest z ich namnażaniem, ponieważ replikacja tych RNA zachodzi według mechanizmu toczącego się koła, dając długie konkatametryczne transkrypty, które następnie zostają pocięte na monomery. Dotyczy to albo tylko nici (+)RNA lub też nici (+) i (−). Domeny katalityczne większości tych RNA tworzą strukturę przypominającą główkę młotka, stąd ich nazwa angielska — *hammerhead ribozymes* [6]. Wyjątkiem jest tu nić (−) *sTRSV*, której aktywna domena katalityczna przyjmuje kształt szpilki (*hairpin ribozyme*) [7]. Odmienną strukturę tworzy też *HDV* [8].

W mitochondriach *Neurospora* wykryto nieznane dotąd krótkie, koliste cząsteczki DNA i kodowane przez nie multimery i monomery RNA (o długości jednostki 881 nukleotydów). Multimery RNA ulegają samocięciu *in vitro* nie tworząc struktur typu *hammerhead*, ich sekwencja wykazuje podobieństwo do sekwencji intronów grupy I [9].

Dobrze poznaną cząsteczką RNA o właściwościach katalitycznych, działającą na odmienny substrat niż na samą siebie, jest RNowy składnik endorybonukleazy RNazy P. Tnie ona pre-tRNA, usuwając prekursorową sekwencję z 5′ końca cząsteczki i tworząc ufosforylowany koniec 5′ dojrzałego tRNA. Wykazano, że przy wysokich stężeniach soli RNA może przeprowadzać tę reakcję bez udziału białka [2].

Zaobserwowano, że *in vitro* może następować samowycinanie 20-nukleotydowego intronu z pętli antykodonowej ludzkiego pre-$tRNA^{Tyr}$. Jak wykazano, nieenzymatyczne cięcie zachodziło głównie na styku 3′ (między intronem a eksonem 3′). Być może, *in vivo* cięcie w tym miejscu także zachodzi autokatalitycznie, a na styku 5′ przy udziale endonukleazy [10].

2,5 S RNA — 31-nukleotydowa cząsteczka RNA, składnik glukozylotransferazy z mięśni królika, katalizującej reakcję rozgałęziania łańcucha glikogenu, uważana była za jedyny rybozym działający na substrat nie będący kwasem nukleinowym [11]. Wynik ten nie został jednak potwierdzony przez inne laboratoria.

Od kilku lat uważa się, że właściwości katalityczne mogą mieć także cząsteczki RNA, które wchodzą w skład kompleksów rybonukleoproteinowych, takich jak:

rybosomy — np. 16S, 23S rRNA *E. coli* posiadają być może aktywność transferazy peptydylowej a 23S rRNA prawdopodobnie bierze także udział w translokacji peptydylo-tRNA [12]

spliceosomy[1] — wchodzące w ich skład małe, jądrowe RNA (snRNA) mogą wykazywać aktywność katalityczną, szczególnie U6, który przypuszczalnie uczestniczy w katalizie cięcia na styku intron-ekson [13].

Być może, aktywności katalityczne mają również inne snRNA — U3, U7, U11, biorące udział w obróbce pre-mRNA i rRNA.

Ponadto przypuszcza się, że rybozymem może być RNowy składnik enzymu rybonukleoproteinowego telomerazy, będącej specyficzną odwrotną transkryptazą, która syntetyzuje bogatą w G nić telomerowego DNA złożoną z sekwencji powtórzonych (6-8-nukleotydowych). RNA telomerazy (długości 159-192 nukleotydów) ma bardzo silnie zachowywaną strukturę drugorzędową; jego fragment jest matrycą, na której syntetyzowane są powtórzenia telomerowe [14].

T. Cech wysunął hipotezę (częściowo już potwierdzoną), że redagowanie[2] RNA może przebiegać według mechanizmu zbliżonego do samowycinania i wstawiania intronu tj. poprzez reakcję transestryfikacji, gdzie intronom odpowiadałyby pojedyncze reszty urydylowe. Katalizatorem tej reakcji mógłby być tak zwany *guide RNA*, czyli krótka cząsteczka RNA (40 nukleotydów) z łańcuchem poli(U) na końcu 3′, niosąca informację o insercji lub delecji urydyn [15].

Specyficzna hydroliza w pętli D $tRNA^{Phe}$ z drożdży, zachodząca *in vitro* pod wpływem hydratu Pb^{2+} (a także Mg^{2+}, Mn^{2+}, i jonów lantanowców) związanego

[1] Patrz: B. Seliwanowicz, *Post. Biochem.*, 1988, **34**, 351
[2] Patrz: M. Szymański, J. Barciszewski, *Post. Biochem.*, 1990, **36**, 2

http://rcin.org.pl

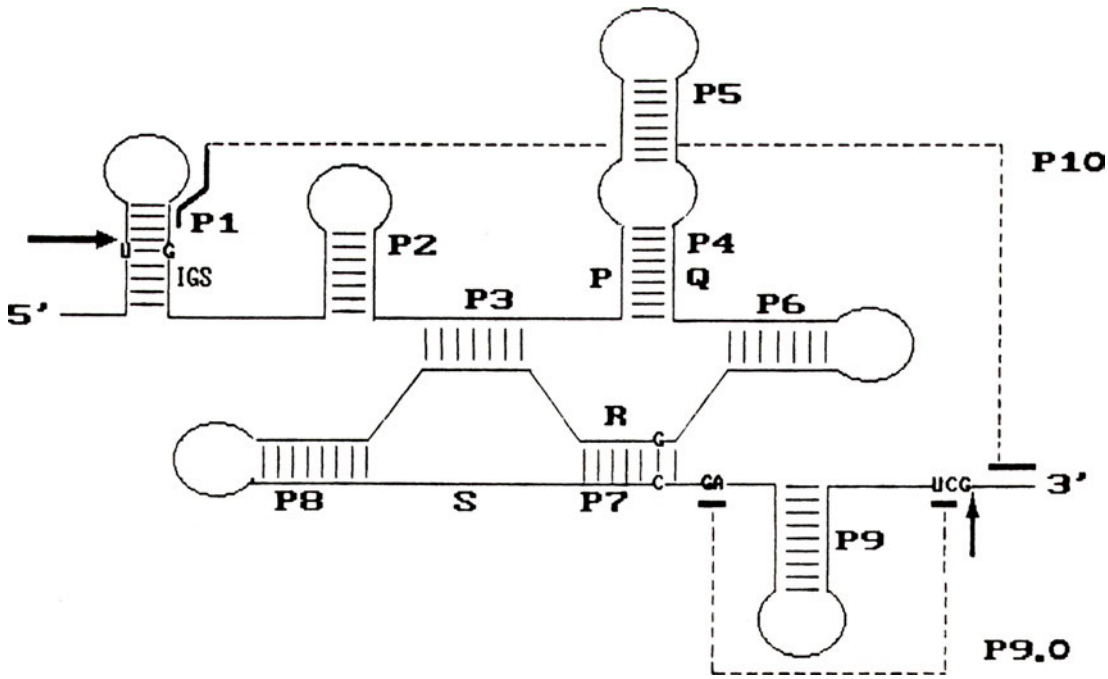
w obszarze pętli TΨC, uważana jest przez wielu autorów za reakcję katalizowaną przez metaloenzym, w tym przypadku kompleks jonu metalu i części 5′ tRNA [16].

II. Struktury rybozymów

W rozdziale tym zostaną przedstawione podstawowe informacje dotyczące budowy cząsteczek RNA uznawanych za rybozymy ze szczególnym uwzględnieniem struktur związanych z ich aktywnością katalityczną.

III-1. Introny grupy I

Najlepiej z nich zbadany jest intron z genu 26S rRNA *T. termophila* o długości 414 nukleotydów. Mimo znacznych różnic w sekwencjach intronów grupy I stwierdzono u wszystkich występowanie w strukturze drugorzędowej podobnego regionu rdzenia (złożonego z około 70 nukleotydów), zawierającego sekwencje i struktury niezbędne dla funkcji katalitycznej. Z dodatkowych nukleotydów, tworzących często długie, otwarte ramki odczytu, uformowane są heliksy i pętle, położone peryferyjnie w stosunku do rdzenia. Większość zachowywanych nukleotydów zebrana jest w czterech krótkich sekwencjach: P, Q, R, S (Ryc. 1). Pozostałe prawie niezmienne nukleotydy to U, poprzedzający miejsce cięcia 5′ i sparowany z nim G, para GC w P3 i G stanowiący ostatni nukleotyd intronu. Sekwencje P, Q, R i S częściowo parują ze sobą, tworząc heliksy P4, P6, i P7, przy czym te fragmenty sekwencji są bardziej zmienne niż regiony jednoniciowe [3]. W heliksie P7 znajduje się uniwersalna para GC (G_{264}-C_{311} u *Tetrahymena*), która prawdopodobnie wiąże GTP w pierwszym etapie samowycinania i ostatni nukleotyd intronu w drugim etapie reakcji [17]. W obrębie 20 nukleotydów od miejsca cięcia 5′ w większości intronów rozpoczyna się IGS — *internal guide sequence*. Region ten hybrydyzuje z końcem eksonu 5′, tworząc heliks P1, a także, w większości intronów, z eksonem 3′, tworząc heliks P10 (często tylko 2 bp) [3]. Powstanie oddziaływań IGS-ekson konieczne jest do zajścia samowycinania intronu, szczególnie odziaływanie IGS-ekson 5′, które jest decydujące w wyborze miejsca cięcia 5′ oraz skierowaniu wolnego końca eksonu 5′ do ataku na styk intron-ekson 3′. W wyborze miejsca cięcia 3′ i przy ligacji eksonów duże znaczenie ma parowanie oznaczone jako P9.O (A_{314} G_{313}-C_{413} U_{412} u *Tetrahymena*) [18]. W trzeciorzędowej strukturze, stabilizowanej przez jony magnezu lub manganu, rdzeń katalityczny znajduje się we wnętrzu cząsteczki [19].

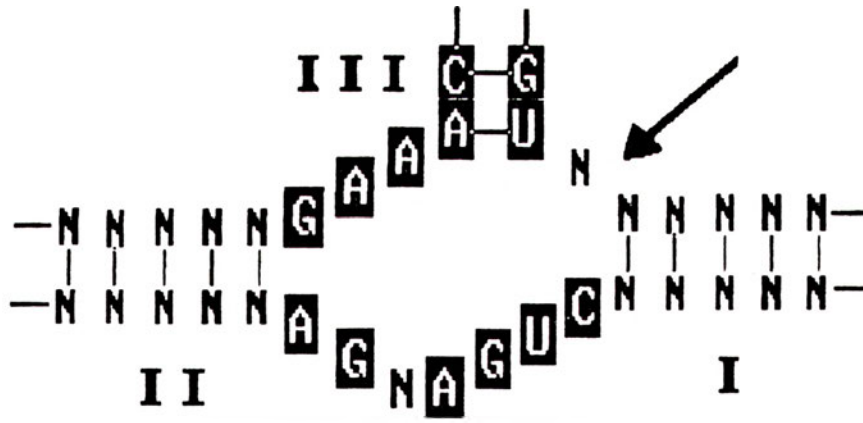


Ryc. 1. Struktura drugorzędowa intronów grupy I (wg [16], zmodyfikowano). Odpowiednimi symbolami oznaczono identyczne dla całej grupy nukleotydy; P, Q, R, S oznaczają sekwencje zachowywane, P1...P10 — stałe elementy struktury drugorzędowej. Strzałkami zaznaczono miejsca cięcia 5′ i 3′.

http://rcin.org.pl

III-2. Introny grupy II

Introny grupy II to sekwencje długie (około 700 nukleotydów) o skomplikowanej strukturze drugorzędowej. Składa się na nią 6 domen położonych peryferyjnie w stosunku do centralnego obszaru jednoniciowego, złożonych z fragmentów heliksów zakończonych pętlami. Największa domena I, stanowiąca ponad połowę długości intronu, zbudowana jest z czterech subdomen, z których dwie są także złożone z kilku obszarów dwuniciowych i pętli. Do nielicznych silnie zachowywanych sekwencji należą: pierwsze i ostatnie nukleotydy intronu, niektóre wewnętrzne pętle i heliks V. Po 2 sekwencje eksonu i intronu długości około 6 nukleotydów, parujące ze sobą, tj. IBS1-EBS1 i IBS2-EBS2 (*intron binding sequence — exon binding sequence*) są zaangażowane w interakcje ekson-intron, konieczne do zajścia samowycinania oraz wyboru miejsca cięcia 5′. IBS1 i 2 znajdują się w eksonie 5′ przy styku ekson-intron, natomiast EBS1 i 2 we wnętrzu intronu. Mutacje w tych regionach, uniemożliwiające parowanie zasad, powodują zaburzenie samowycinania intronu. Jedną z najbardziej stałych cech struktury intronów II grupy jest „wystająca" adenozyna, oddalona o 7 lub 8 nukleotydów od 3′ końca intronu, która pełni podstawową rolę przy tworzeniu lassa. Drugim takim elementem jest szpilka V, niezbędna do zajścia cięcia na styku intron-ekson 5′ [4].



Ryc. 2. Budowa centrum aktywnego rybozymów o strukturze *hammerhead* (wg [5], zmodyfikowano). Przedstawiono nukleotydy zachowane we wszystkich znanych rybozymach tej grupy. Literami ‚N' oznaczono nukleotydy zmienne, zaś cyframi rzymskimi heliksy, będące stałym elementem struktury; strzałka wskazuje miejsce cięcia.

III-3. Rybozymy o strukturze *hammerhead*

W wyniku porównania wszystkich znanych sekwencji RNA samotnących patogenów roślin i transkryptu DNA 2 traszki powstał model domeny katalitycznej, identycznej dla całej tej grupy. Składają się nań 3 heliksy ułożone wokół jednoniciowego regionu rdzenia o kształcie główki młotka, zawierającego 11 stałych zasad (Ryc. 2.). Sekwencja fragmentów dwuniciowych nie jest silnie zachowywana, oprócz heliksu III, złożonego z 2 niezmiennych par zasad. Cięcie zachodzi za sekwencją GUX, gdzie X nie może być resztą guanozynową. Wykazano, że możliwe jest samocięcie rybozymu złożonego tylko z 52 nukleotydów. ASBV i transkrypt satelitarnego DNA 2 traszki, które mają bardzo krótki heliks III z bardzo małą pętlą, mogą ulegać samocięciu po utworzeniu struktur dimerycznych. Ponadto możliwe jest zachodzenie cięcia *trans*, gdy katalizator i substrat znajdują się na oddzielnych cząsteczkach, muszą one jednak parować ze sobą, tworząc aktywną strukturę *hammerhead* [5, 6].

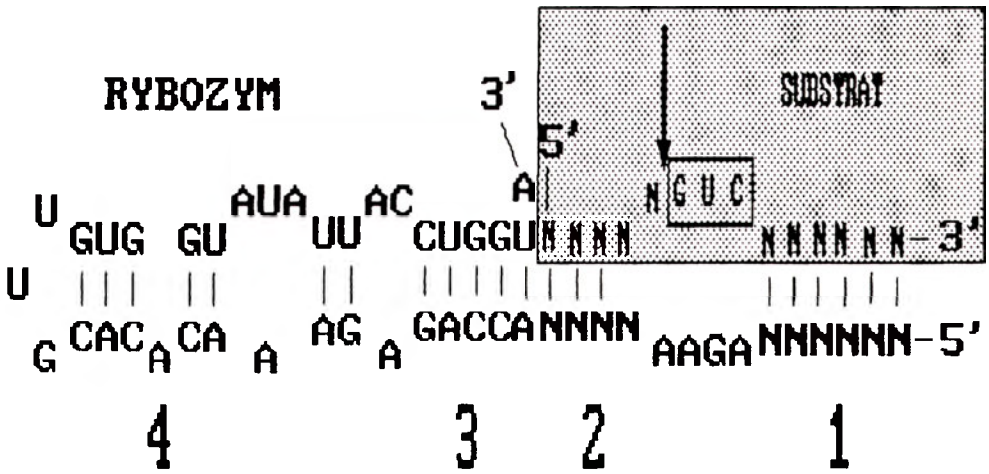
III-4. Rybozym o strukturze *hairpin*

Jedynym przykładem rybozymu tworzącego aktywną strukturę szpilki jest nić (−) satelitarnego RNA wirusa plamistości tytoniu ((−) *sTRSV*) o długości 359 nukleotydów. Na katalityczne centrum składają się tu 2 sekwencje RNA:RNA katalityczne o długości 50 nukleotydów i RNA substratowe o długości 14 nukleotydów. Ta nowa struktura zbudowana jest prawdopodobnie z czterech regionów sparowanych zasad (Ryc. 3.). Dwa heliksy tworzą się między katalizatorem a substratem, tj. heliks I — 4 pz i II — 6 pz, dwa pozostałe w obrębie rybozymu. Sekwencja heliksów substrat-katalizator może być dowolnie zmieniana bez utraty aktywności rybozymu pod warunkiem, że zachowane zostało parowanie zasad. Cztery pozostałe nukleotydy substratu tworzą pętlę o sekwencji AGUC, gdzie A, za którym następuje cięcie, może być zastąpione dowolnym nukleotydem [7].

III-5. Wirus delta żółtaczki

Stanowi on odrębny typ rybozymu samotnącego. Jego genom zbudowany jest z jednoniciowej, kolistej cząsteczki RNA długości 1.7 kz i ma wiele cech wirusoidów i stelitarnych RNA roślin, min. wykazuje wysoką komplementarność wewnątrzcząsteczkową oraz zawiera pewne sekwencje ważne dla replikacji wiroidów. RNA *HDV* jest jednak większy od wiroidowego i koduje co najmniej jedno białko strukturalne (antygen δ). Replikacja, jak u wiroidów, zachodzi według mechanizmu toczącego się koła, tj. z powstawaniem długich nici (+) i (−). Wykazano, że autokatalityczne cięcie następuje w obu niciach RNA,

http://rcin.org.pl



Ryc. 3. Budowa centru katalitycznego rybozymu o strukturze *hairpin* (wg [7], zmodyfikowano). Centrum aktywne tworzą dwa fragmenty (−)RNA *sTRSV* — RNA substratu, długości 14 nukleotydów (umieszczony w ramce) i RNA katalityczny, długości 50 nukleotydów. Litery ‚N' oznaczają nukleotydy, których zamiana nie wpływa na aktywność rybozymu, zaś cyfry arabskie heliksy, będące podstawowym elementem struktury drugorzędowej. Strzałką oznaczono miejsce cięcia.

w genomowym RNA między U688 a G689, a w antygenomowym między G900 i C901, zaś obszary otaczające miejsca cięcia wykazują znaczne podobieństwo (80%) [8, 20]. Środkowy odcinek genomu jest zachowywany, co wykazano ustalając sekwencje różnych szczepów. Wydaje się, że aby mogło nastąpić cięcie (+) i (−)RNA niezbędne są domeny aktywne obejmujące sekwencje długości około 100 nukleotydów wokół miejsca cięcia, choć na aktywność tych rybozymów i ich stabilność mają wpływ sekwencje bardziej oddalone [8, 20, 21]. Sugeruje się powstawanie aktywnej struktury „koniczynki" w genomowym RNA, umożliwiającej zajście reakcji [20].

III-6. RNA — składnik RNazy P

Najlepiej znany to M1 RNA z *E. coli*, o długości 375 nukleotydów. Kofaktor białkowy RNazy P (białko C_5) ułatwia przyjęcie odpowiedniej konformacji rybozymu (tę rolę mogą spełniać jony Mg^{2+} i Mn^{2+} [22]. Właściwości katalityczne RNA związane są z zachowywanymi filogenetycznie strukturami, stanowiącymi rdzeń cząsteczki [23]. Zasadniczymi ich elementami są 3 jednoniciowe domeny i kilka heliksów, często zakończonych pętlami. Znaleziono 2 regiony krytyczne dla aktywności enzamatycznej tj. nukleotydy 20-95 i 205-255. Główne regiony oddziaływań tRNA-RNA rybozymu znajdują się między nukleotydami 248-249 i 300-333. Ponadto nukleotyd 92 bierze udział w wiązaniu tRNA [24, 25]. Usunięcie kilkudziesięciu nukleotydów z 5′ czy 3′ końca nie likwiduje aktywności enzymu, o ile nie zmienia się równocześnie obu końców [22].

[3] Dokładny opis mechanizmów i kinetyki reakcji można znaleźć m.in. w pracach: M. Z. Barciszewska, J. Barciszewski, *Wiad. Chem.*, 1988, **7-8**, 545; D. Herschlag, T. R. Cech, *Biochemistry*, 1990, **29**, 10159 i 10172

IV. Mechanizmy reakcji

Reakcje katalizowane przez rybozymy zachodzą *in vitro* bez udziału białek, w obecności jonów dwuwartościowych (Mg^{2+}, Mn^{2+}). *In vivo* białka związane z RNA mogą ułatwiać powstawanie aktywnej konformacji rybozymu lub odpowiedniego środowiska reakcji. Do jej zajścia niezbędne jest tworzenie właściwych struktur i kompleksów trzeciorzędowych, odpowiednio orientujących reagujące grupy. Kompleksy te obniżają energię aktywacji wystarczająco i dość specyficznie, aby nastąpiło rozerwanie i przeniesienie (transestryfikacja) lub specyficzna hydroliza określonego wiązania nukleotydowego [5, 26]. Najczęściej proponowanym mechanizmem reakcji jest podstawienie nukleofilowe typu S_N2P [26, 27]. Zmiana energii swobodnej jest niewielka, reakcja przebiega w pobliżu stanu równowagi a o jej przesunięciu w jedną stronę decydują stężenia substratów i produktów, typ produktów oraz warunki reakcji (czyli czynniki takie, jak np. stężenie GTP, Mg^{2+})[3]. Procesy samocięcia i samowycinania intronów są procesami transestryfikacji tj. przeniesienia wiązań fosfoestrowych z zachowaniem całkowitej ich liczby [26].

IV-1. Samowycinanie intronów

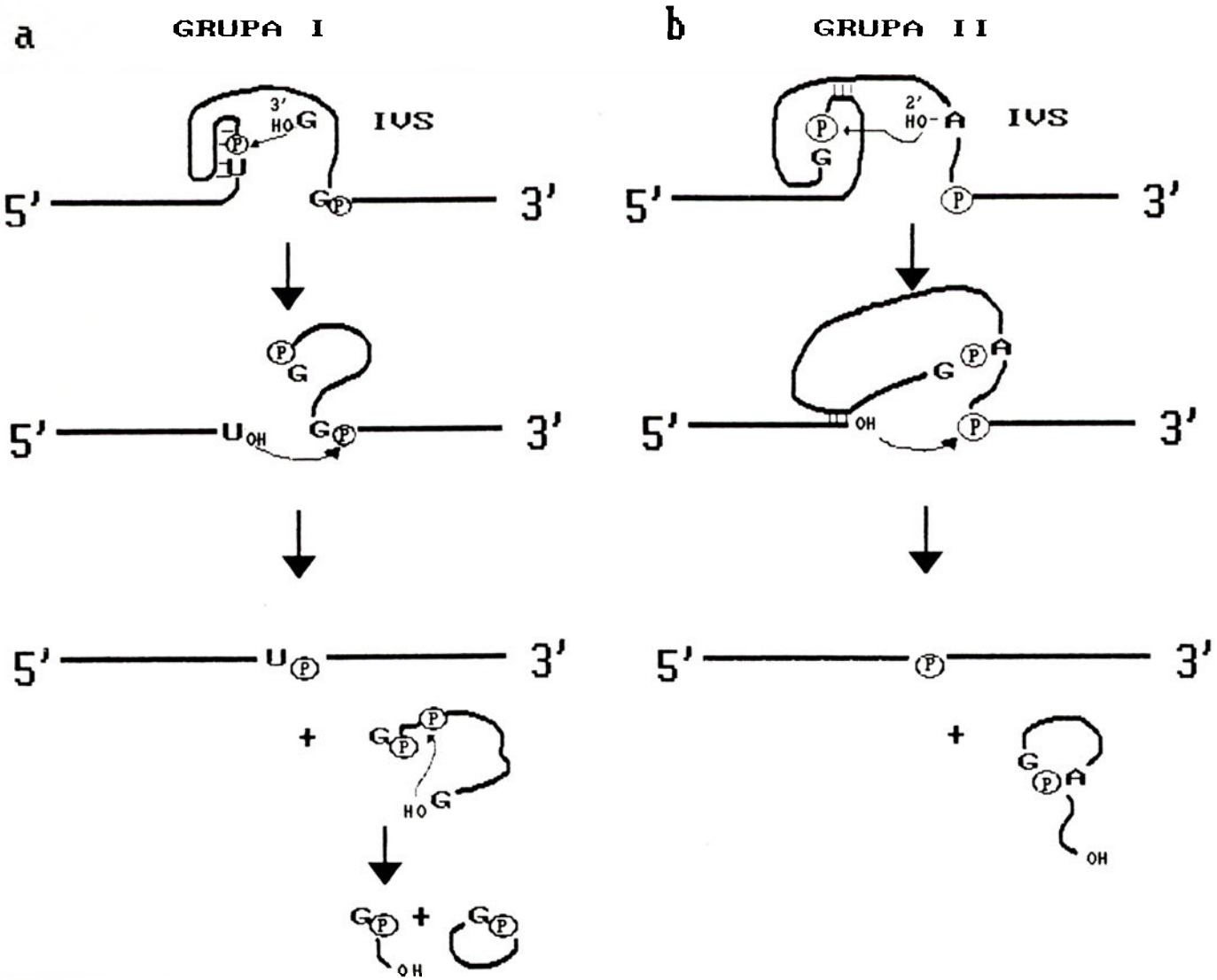
Jest to dwuetapowa transestryfikacja, czyli dwa następujące po sobie przeniesienia wiązań fosfoestrowych; powstające cząsteczki RNA mają grupę OH na końcu 3′ i fosforan na końcu 5′.

Introny grupy I. Charakterystyczna dla tej grupy jest inicjacja reakcji przez wolną guanozynę lub jej pochodne. Konieczne jest odpowiednie ukierunkowanie reagujących grup, polegające na parowaniu IGS z sekwencją położoną na końcu eksonu 5′; oddziaływania P9.0, P10 (Ryc. 1.) przygotowują miejsce cięcia 3′ na atak eksonu 5′. Wiązania fosfodwuestrowe w miejscu cięcia i w miejscu wiązania guanozyny są szczególnie podatne na atak nukleofilowy. W pierwszym etapie składania grupa 3′OH wolnego GTP, związanego

http://rcin.org.pl

wstępnie przez selektywną kieszeń RNA (w przypadku intronu *Tetrahymena* — nukleotyd G_{264} i sąsiednie), dokonuje ataku nukleofilowego na wiązanie fosfodwuestrowe na styku (miejscu cięcia) 5′ i wiąże się kowalencyjnie z ostatnim nukleotydem eksonu 5′ (Ryc. 4.a). Związanie terminalnej guanozyny intronu z miejscem wiążącym guanozynę aktywuje grupę 3′OH końcowej urydyny eksonu 5′ do ataku na miejsce cięcia 3′. W rezultacie następuje transestryfikacja prowadząca do połączenia eksonów [18, 26]. Uwolniony intron podlega serii cyrkularyzacji i specyficznych hydroliz, dających jako produkt liniowy intron bez końcowych 19 nukleotydów, zawierających miejsca cyrkularyzacji [26]. Reakcja samowycinania jest odwracalna. Udowodniono, że *in vitro*, w warunkach wysokiego stężenia intronu i zligowanych eksonów, a także Mg^{2+}, przy braku guanozyny, następuje wstawienie intronu we właściwe położenie między eksonami [28]. Dla wielu intronów grupy I nie wykazano zachodzenia samowycinania *in vitro*, prawdopodobnie do przyjęcia aktywnej konformacji wymagany jest udział białka. W przypadku niektórych intronów mitochondrialnych byłaby to kodowana przez nie maturaza [29].

Introny grupy II. Samowycinanie zachodzi tu bez udziału wolnych nukleotydów, mechanizm reakcji zbliżony jest do składania jądrowego pre-mRNA, stąd przypuszczenie, że proces zachodzący z udziałem spliceosomu jest ewolucją pochodną samowycinania intronów grupy II [29]. Do zajścia składania konieczna jest hybrydyzacja sekwencji IBS1-EBS1. Reakcję inicjuje atak nukleofilowy grupy 2′OH wewnętrznego nukleotydu intronu — adenozyny (położonej 7-8 nukleotydów od styku 3′) na wiązanie fosfodwuestrowe na styku 5′ (Ryc. 4.b). W wyniku pierwszej transestryfikacji powstaje tzw. lasso, czyli pętla zamknięta przez adenozynę tworzącą wiązanie 2′,3′-fosfodwuestrowe. Grupa 3′ OH eksonu 5′ atakuje miejsce cięcia 3′. W wyniku tak zachodzącej końcowej transestryfikacji następuje łączenie eksonów i uwolnienie intronu. Reakcja ta jest odwracalna *in vitro*, choć jej równowaga przesunięta jest wyraźnie w kierunku wycinania intronu [26, 28].



Ryc. 4. Przebieg samowycinania intronów grup I i II (wg [26, 27], zmodyfikowano).
Giętą linią przedstawiono intron (IVS), kreseczkami oznaczono parowanie na styku ekson 5′-intron (a) i EBS-IBS (b).
Dokładny opis w tekście.

http://rcin.org.pl

IV-2. Mechanizm samocięcia

Jest to proces jednoetapowej transestryfikacji, w którym cięcie wiązania międzynukleotydowego następuje poprzez katalizowany przez Mg^{2+} atak grupy 2'OH na wiązanie fosfodwuestrowe przy najbliższej grupie 3' OH. W efekcie powstaje cykliczny 2',3' fosforan na 3' końcu jednego produktu i grupa hydroksylowa na 5' końcu drugiego. W przypadku rybozymów o strukturze *hammerhead* reakcja ta jest nieodwracalna. Przy cięciu *trans* te RNA działają jak prawdziwe enzymy (o liczbie obrotów do 1 min^{-1}) [5, 30].

Rybozym o strukturze *hairpin*. Ulega on samocięciu prawdopodobnie wg mechanizmu proponowanego dla rybozymów o strukturze *hammerhead*, powstają te same końce (cykliczny 2',3' fosforan i 5'OH). Aby zaszła reakcja konieczne jest tylko parowanie rybozym-substrat w heliksach I i II, ich sekwencja wpływa jednak na wartość K_m i k_{cat}. Najefektywniejszy otrzymany dotąd rybozym charakteryzował się k_{cat} = 7,1 min^{-1}. Samocięcie (−) *sTRSV* jest odwracalne, oba procesy są w równowadze, której przesunięcie zależy od warunków reakcji [5, 7].

HDV — samocięcie zachodzi prawdopodobnie według tego samego mechanizmu, jak w przypadku poprzednich rybozymów, powstają produkty o takich samych końcach [8]. Wzrost szybkości reakcji następuje pod wpływem czynników denaturujących, takich jak mocznik lub formamid, prawdopodobnie wskutek destabilizacji pewnych struktur, tworzonych przez sekwencje otaczające miejsce cięcia i dających formę nieaktywną rybozymu. Niektóre pochodne rybozymu (180-nukleotydowy fragment (−) *HDV*) zachowują aktywność nawet w 18 M formamidzie, w 75°C [21]. Reakcja zachodzi szybko nawet przy bardzo niskim stężeniu Mg^{2+}(k_{cat} rzędu 1-2 min^{-1}). Samocięcie (+) RNA jest odwracalne; o kierunku reakcji decyduje obecność jonów Mg^{2+}, przy ich braku, np. po dodaniu EDTA, nastąpi ligacja, o ile rozcięte fragmenty są jeszcze połączone wiązaniami wodorowymi [20, 31].

IV-3. RNaza P

Do zajścia reakcji odcinania sekwencji prekursorowej z pre-tRNA potrzebne jest wysokie (około 100 mM) stężenie jonów dwudodatnich (Mg^{2+}, Mn^{2+}) albo białko (C_5), umożliwiające przyjęcie przez RNA struktury aktywnej, modyfikujące specyficzność substratową, szybkość reakcji, ekranujące elektrostatyczne odpychanie rybozym-substrat tRNA [22, 32]. Wymagany substrat, jak ostatnio wykazano, musi zawierać tylko ramię aminoacyloakceptorowe, długości co najmniej 6 pz, sekwencję CCA na 3' końcu (jej brak lub zmiany drastycznie obniżają szybkość reakcji katalizowanej przez sam RNA) oraz kilka nukleotydów na 5' końcu. Heliks może powstawać poprzez parowanie substratu z oddzielnym, komplementarnym fragmentem RNA (*external guide sequence*), można więc ciąć prawie dowolne RNA [24, 33]. Mechanizm reakcji jest odmienny od dotychczas omówionych, nie przebiega ona drogą transestryfikacji — prawdopodobnie główną rolę odgrywa w niej kompleks Mg-H_2O i cząsteczka wody, wiążąca się z nim oraz z rybozymem wiązaniami wodorowymi. Cząsteczka ta, zaktywowana przez enzym RNowy i kompleks Mg-H_2O atakuje wiązanie fosfodwuestrowe w pre-tRNA (także związanym przez ten kompleks). W wyniku tej specyficznej hydrolizy powstają cząsteczki z grupą OH na 3' końcu i fosforanem na 5' końcu [27].

V. Inne aktywności rybozymów

Rozpoczęto doświadczenia nad możliwością katalizowania przez rybozymy różnych typów reakcji. Najszerzej wykorzystywane są w tych badaniach pochodne intronu *Tetrahymena*, np. L-19IVS RNA i L-21IVS RNA — introny liniowe, skrócone, pozbawione sekwencji umożliwiających cyrkularyzację.

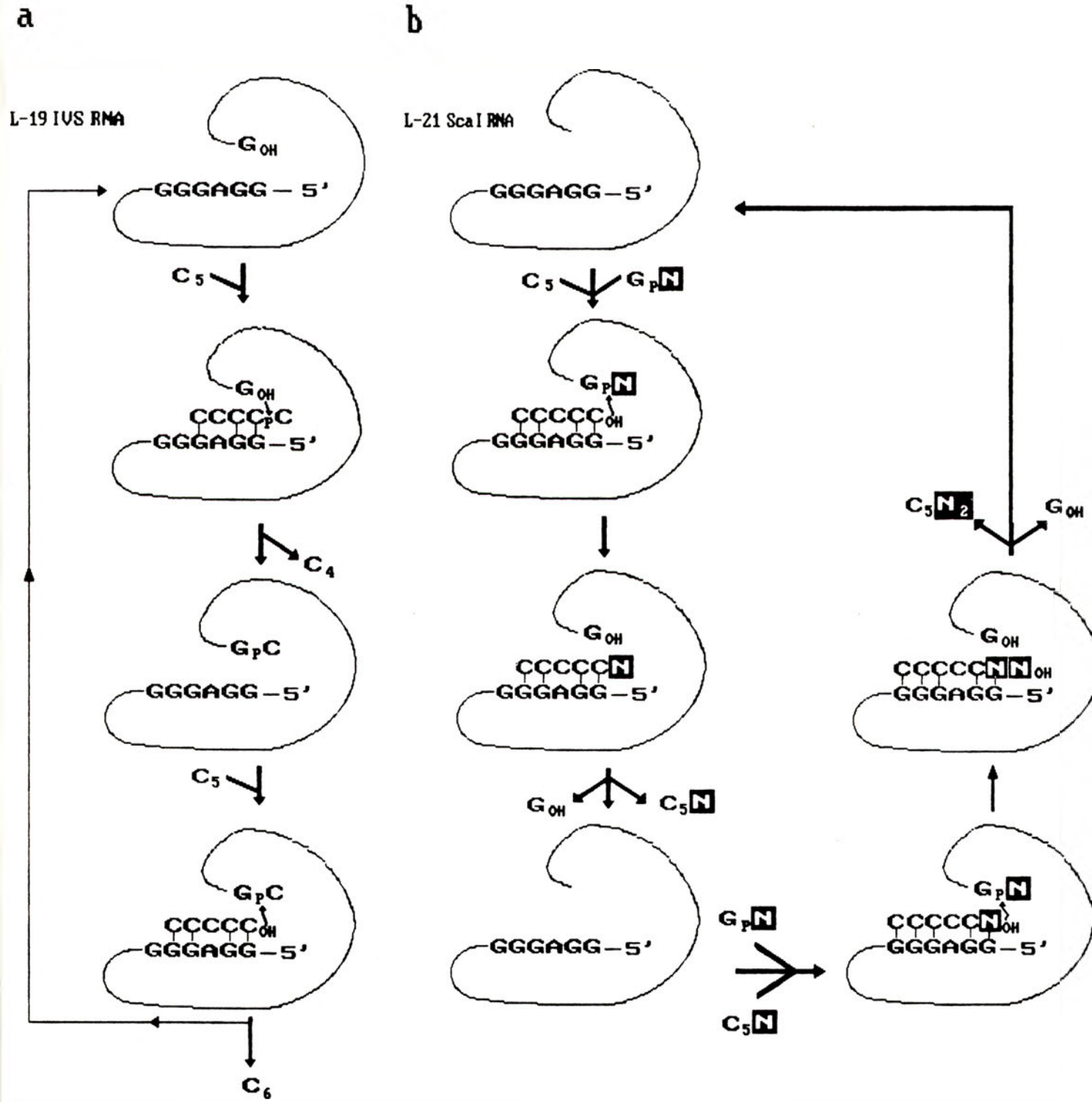
Endorybonukleaza. Introny grupy I i II wykazują tę aktywność w trakcie samowycinania, ale L-19IVS RNA przejawia ją także w stosunku do innych substratów — jednoniciowych RNA, komplementarnych do IGS [34]. Specyficzność substratowa podobna jest do specyficzności restryktazy DNA. Cięcie następuje w miejscach odpowiadających miejscu cięcia 5' pre-rRNA, z udziałem wolnej guanozyny lub GTP, reakcja przypomina pierwszy etap samowycinania. Rybozym rozróżnia stopnie sparowania — ilość zasad hybrydyzujących z IGS, preferuje substraty najbardziej komplementarne. Prowadzenie reakcji w warunkach utrudniających parowanie zasad zwiększa jej specyficzność [34]. Podobnie, jako endorybonukleazy tnące różne substraty, wykorzystuje się rybozymy o strukturze *hammerhead*, *hairpin*, RNA RNazy P.

Endonukleaza tnąca jednoniciowy DNA. L-21 IVS RNA ScaI działa jako specyficzna endonukleaza, o mechanizmie reakcji analogicznym do opisanego powyżej (z udziałem GTP). Cięcie substratu DNA, komplementarnego do IGS, zachodzi w tym samym miejscu co odpowiadającego mu RNA. K_m jest jednak wyższe 10^4 razy, szybkość reakcji 10 razy mniejsza, co świadczy o istotnej roli grupy 2'OH rybozy w katalizie prowadzonej przez rybozymy, tj. w wiązaniu substratu i przyjęciu właściwej geometrii heliksu; prawdopodobnie jest ona także konieczna do stabilizacji stanu przejściowego kompleksu [35]. Otrzymano mutanta delecyjnego, który tnie jednoniciowy DNA lepiej niż dziki rybozym RNA. Prawdopodobnie mechanizm reakcji jest odmienny, z udziałem katalizowanej przez rybozym miejscowo-specyficznej hydrolizy [36]. Rybozymy o strukturze *hammerhead* przeprowadzają cięcie oligodezoksynukleotydów, zawierających 1 lub 2 rybonukleotydy w miejscu cięcia, jednak efektyw-

http://rcin.org.pl

ność reakcji jest znacznie niższa (7-8 razy) niż dla substratów RNA, wskutek słabszego wiązania i zmian w strukturze miejsca aktywnego [37].

Nukleotydylotransferaza. Transfer nukleotydów katalizowany jest przez L-19, L-21 IVS RNA. Po każdej rundzie reakcji następuje regeneracja rybozymu, polegająca na dysocjacji substratu i pojawieniu się formy wyjściowej rybozymu. Substrat wiąże się z IGS, po powstaniu kompleksu grupa 3'OH ostatniego nukleotydu intronu G_{414} dokonuje ataku nukleofilowego na atom fosforu substratu (przy ostatniej cytydynie) i powstaje przejściowo wiązanie kowalencyjne (Ryc. 5.a). Substrat zostaje oddysocjowany, a związany nukleotyd uwolniony wskutek specyficznej hydrolizy (między G_{414} a związanym nukleotydem). Rybozym może się też zregenerować po przyłączeniu nowego substratu, wydłużając go przez transestryfikację (np. $C_5 \rightarrow C_6$). Typową reakcją jest dysproporcjonowanie: np. z dwu cząsteczek C_5 powstają cząsteczki C_4 i C_6 [26, 38].



Ryc. 5. Mechanizm reakcji: transferu nukleotydów (a) i polimeryzacji (b), katalizowanych przez zmodyfikowany intron *Tetrahymena* (wg [26, 36], zmodyfikowano).
C_4, C_5, C_6 oznaczają odpowiednio cztero-, pięcio- i sześcio-rybonukleotydy cytydylowe. Ryc. 5.b. przedstawia dystrybucyjną drogę polimeryzacji, objaśnienia w tekście.

http://rcin.org.pl

Polimeraza RNA. L-21 Scal RNA katalizuje reakcję wydłużania substratu, kwasu pentacytydylowego, nawet do dwunastonukleotydu. Miejsce wiążące substrat (primer), odpowiadające IGS, jest zarazem matrycą, która być może ślizga się przez centrum aktywne w sposób odpowiadający właściwej matrycy (Ryc. 5.b). Do reakcji niezbędny jest dwunukleotyd CpN, gdzie N nie może być guanozyną, gdyż powoduje to cięcie substratu. Obserwuje się wpływ matrycy na dodawanie nukleotydów (preferencja tych, które tworzą z nią pary Watsona-Cricka), choć nie jest to w pełni polimeryzacja matryco-zależna. Istnieją dwie hipotetyczne drogi przebiegu reakcji [38]:

dystrybucyjna — primer C_5 hybrydyzuje z IGS, GpN przyłącza się zaś do miejsca wiążącego styk intron-ekson 3′, następuje transestryfikacja, zbliżona do drugiego etapu samowycinania — pN zostaje przeniesiony na 3′ koniec C_5, wolna guanozyna zostaje oddysocjowana; następuje przesunięcie — ślizganie oligonukleotydu o 1 zasadę i powtórzenie procesu po związaniu nowego GpN (Ryc. 5.b).

procesywna — przyłączenie C_5 zachodzi nieco dalej w kierunku 3′ końca rybozymu i kolejne rundy dołączania nukleotydów zachodzą bez oddysocjowania wydłużanego łańcucha.

Stosując zmutowany rybozym (ze zmienionym miejscem wiążącym guanozynę), można wydłużyć primer stosując wszystkie 4 nukleotydy w formie 2-aminopuryno-pN [39].

Intron *Tetrahymena* liguje także nukleotydy komplementarne do zewnętrznej matrycy, z liczbą obrotów do 4 min^{-1} [40]. Innym rybozymem katalizującym reakcję polimeryzacji jest pochodna intronu *sunY* — skrócony intron, ze zmienioną nieco sekwencją, pocięty na 3 fragmenty, które tworzą aktywny kompleks katalityczny. Intron ten przeprowadza analogiczną do intronu *Tetrahymena* ligację 9-10-nukleotydów, komplementarnych do zewnętrznej matrycy lub do jednej z własnych podjednostek [41].

Fosfotransferaza i kwaśna fosfataza. L-19 IVS RNA posiada aktywność fosfotransferazy przenoszącej 3′ końcową grupę fosforanową z jednego nukleotydu na drugi; zachodzi to prawdopodobnie w tym samym miejscu aktywnym co inne reakcje rybozymu. Grupa fosforanowa przenoszona jest na 3′ końcową guanozynę L-19 IVS RNA. Powstaje przejściowo fosfoenzym, który może przenieść fosforan na dodany do reakcji oligonukleotyd (fosfotransferaza) lub w pH 4.0 ulec hydrolizie, uwalniając nieorganiczny fosforan (fosfataza) [26].

Rekombinacja RNA *in vitro*. Mitochondrialny intron drożdżowy grupy II — *bI1* katalizuje miejscowo-specyficzną rekombinację RNA *in vitro*. W wyniku inkubacji intronu (w postaci lassa lub w formie liniowej) z dwiema różnymi cząsteczkami RNA, z których każda zawiera sekwencję IBS1 — komplementarną do EBS1 intronu, oprócz normalnych produktów odwrócenia reakcji samowycinania, powstają cząsteczki zawierające połączone ze sobą fragmenty różnych RNA; miejsce rekombinacji położone jest bezpośrednio 3′ za IBS1. Prawdopodobnie w pierwszym etapie wstawiania intronu, cząsteczki RNA wchodzą w interakcję z lassem poprzez parowanie IBS1-EBS1, powstaje kowalencyjnie powiązany produkt — intron-ekson 3′ i związany z intronem niekowalencyjnie ekson 5′. W tym momencie może nastąpić wymiana eksonów 5′, a następnie drugi etap reakcji, tj. połączenie eksonów przez kolejną transestryfikację [42].

V. Rybozymy w terapii genowej

Wykrycie katalitycznych właściwości cząsteczek RNA, a zwłaszcza zdolności do cięcia egzogennego RNA, doprowadziło do koncepcji wykorzystania tych aktywności w celu otrzymania zmodyfikowanych organizmów, do zwalczania infekcji wirusowych w terapii genowej poprzez cięcie i blokowanie aktywności konkretnych cząsteczek RNA w obrębie komórki. Najbardziej obiecującym kandydatem do tej roli wydaje się rybozym o strukturze *hammerhead*, kolejnym — rybozym o strukturze *hairpin*, o wyższej od poprzedniego aktywności katalitycznej. Z opisanych dotąd eksperymentów wynika jednak, że prawie wszystkie badane rybozymy mogą być w przyszłości wykorzystane w terapii genowej.

Przeprowadzono szereg doświadczeń *in vitro* z użyciem rybozymów *hammerhead* skonstruowanych tak, aby poprzez parowanie rozpoznawały specyficznie i cięły konkretne cząsteczki RNA. Wiele z tych reakcji zachodzi z powodzeniem *in vivo*.

Pierwszymi takimi katalitycznymi RNA były 3 oligonukleotydy skierowane przeciwko mRNA kodującemu acetylotransferazę chloramfenikolową (CAT), zawierające niezbędne nukleotydy tworzące domenę katalityczną i sekwencje komplementarne do ciętego RNA. Przeprowadzały one *in vitro* specyficzne cięcie substratu [43].

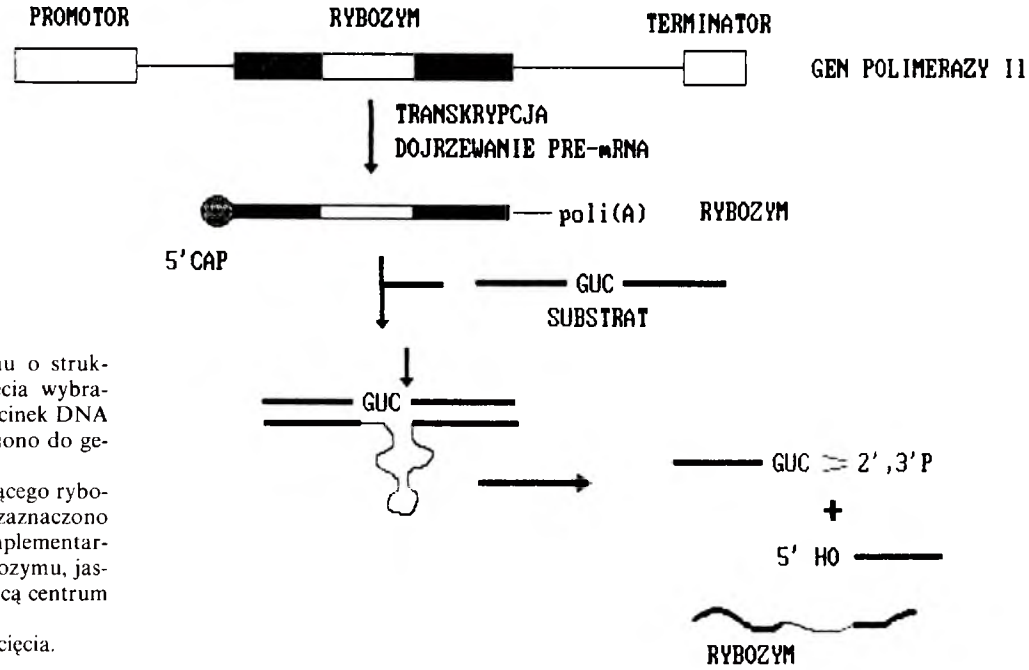
Na razie tylko *in vitro* uzyskano cięcie RNA *PLRV* (wirusa liściozwoju ziemniaka), stosując dwa syntetyczne rybozymy o ramionach komplementarnych do fragmentów sekwencji białka płaszcza i RNA-zależnej polimerazy RNA, które są niezbędne dla infekcyjności wirusa [44].

W przypadku eksperymentów *in vivo* można zastosować dwie strategie wprowadzania katalitycznych cząsteczek RNA do komórek. Jedną z nich jest technika bezpośredniego umieszczania w komórkach aktywnych rybozymów. Zaletą tego podejścia jest możliwość wprowadzenia dowolnie skonstruowanego rybozymu (także zmodyfikowanego w celu zwiększenia stabilności); wadą, że daje to tylko efekt przejściowy — do momentu degradacji rybozymu i wymaga wielu jego kopii [45]. W jednym z doświadczeń tego typu wprowadzono do oocytów *Xenopus laevis* poprzez mikroiniekcję rybozym skierowany przeciwko jednej

http://rcin.org.pl

z domen 28S rRNA i wykazano poprawne cięcie rRNA i inhibicję syntezy białka [46].

Druga technika polega na wprowadzaniu genów kodujących rybozymy. Można to osiągnąć wstawiając np. DNA kodujący rybozym do genu transkrybowanego przez polimerazę II lub III (Ryc. 6.). Uzyskuje się w ten sposób namnożenie rybozymu, możliwość jego dziedziczenia, chronienie RNA np. przez 5′ cap i sekwencję poli (A) [47].



Ryc. 6. Strategia użycia rybozymu o strukturze *hammerhead* do cięcia wybranych cząsteczek RNA. Odcinek DNA kodujący rybozym wstawiono do genu polimerazy II.
W obrębie odcinka kodującego rybozym ciemnym kolorem zaznaczono sekwencje substratu i komplementarne do nich fragmenty rybozymu, jasnym zaś sekwencję tworzącą centrum aktywne.
Strzałka oznacza miejsce cięcia.

Tę technikę zastosowali w swoim eksperymencie Cotton i Brinstiel, wstawiając do pętli antykodonowej genu na $tRNA^{Met}$ rybozym skierowany do cięcia U7 RNA. Po wprowadzeniu chimerycznego genu na plazmidzie do oocytu *Xenopus*, obserwowano jego aktywną transkrypcję, a powstająca 125-nukleotydowa cząsteczka ribtRNA przedostawała się do cytoplazmy, gdzie cięła U7 RNA [47]. W innym doświadczeniu wprowadzano odcinek DNA kodujący rybozym skierowany przciwko mRNA CAT do genu polimerazy II, poprzedzonego wczesnym promotorem SV40 i uzyskano znaczne obniżenie aktywności acetylotransferazy w transfekowanych komórkach ssaczych [48]. Podobna strategia zastosowana została w eksperymencie, który doprowadził do zablokowania replikacji wirusa HIV-1. Kulturę tkankową komórek $CD4^+$ HeLa transfekowano ssaczym wektorem ekspresyjnym, w którym za silnym, konstytutywnym promotorem β-aktynowym umieszczono sekwencje kodujące rybozym skierowany przeciwko RNA gag. Stabilne transformanty produkowały katalityczny RNA. Po zainfekowaniu tych komórek wirusem HIV-1, wykazano powstawanie produktów cięcia, stwierdzono niższy poziom RNA gag oraz antygenu p24 niż w komórkach nietransformowanych. Co więcej, w komórkach wyrażających rybozym było około sto razy mniej prowirusowego DNA niż w komórkach macierzystych [49]. Inna grupa badaczy wykazała efektywne cięcie RNA integrazy HIV-1 i blokadę syntezy białka przez rybozymy skierowane przeciwko temu RNA po wprowadzeniu genów kodujących integrazę i rybozymy do komórek *E. coli* [50].

Zakończone sukcesem doświadczenia, w których nie stwierdzono toksyczności rybozymów dla gospodarza, budzą nadzieję na szersze ich wykorzystanie w terapii genowej. Konieczna jest optymalizacja działania rybozymów poprzez odpowiednie dobieranie miejsc cięcia (sekwencje zachowywane, bez struktury drugorzędowej, miejsca składania, jednoniciowe pętle), zwiększenie specyficzności poprzez dobranie optymalnej długości sekwencji komplementarnej do sekwencji wokół miejsca cięcia oraz skierowanie rybozymu do odpowiedniego przedziału komórkowego [47].

VII. Nowe poglądy na ewolucję

Wykrycie katalitycznych właściwości RNA zmieniło poglądy na temat ewolucji prebiotycznej na Ziemi. Fakt, że RNA posiada zdolności katalityczne i może działać jako własna polimeraza, pozwala na przyjęcie poglądu, że RNA było pierwotną, samoreplikującą się cząsteczką i że współczesne systemy biologiczne powstały na drodze ewolucji ze świata RNA, w którym genomy i enzymy były RNowe. Przemawia za tym także wiele innych danych, świadczących o bardzo istotnej roli rybonukleotydów i cząsteczek RNA w syntezie dezoksyrybonukleotydów, replikacji DNA i katalizie prowadzonej przez enzymy białkowe. Te informacje pozwalają sądzić, że synteza DNA pojawiła się po ustaleniu systemu kopiującego RNA, że przed pojawieniem się katalizatorów białkowych mogły powstać już wcześniej złożone aktywności metaboliczne „rybo-organizmów" („organizmów" zbudowanych z RNA). Etapem przejściowym mógł być świat rybonukleoprotein. Za stopniowym przejmowaniem funkcji en-

http://rcin.org.pl

zymatycznych RNA przez białka przemawia fakt, że kompleksy rybonukleoproteinowe, takie jak rybosomy i spliceosomy, odgrywają wciąż niezwykle istotną rolę w metabolizmie, i wysuwane są przypuszczenia, że ich składniki RNowe posiadają aktywności katalityczne [51, 52].

Postulowany przebieg ewolucji [51]:

1. W płynnym i otwartym środowisku bezkomórkowym („pierwotnej zupie") przeważały cząsteczki RNA i proste cząsteczki organiczne, m.in. aminokwasy, które mogły być wykorzystywane przez nośniki RNowe na szlakach biosyntezy. Szlaki te stawały się coraz bardziej skomplikowane, aż do powstania metabolosomów — organizujących struktur RNA. Zawierały one rodzaj kodu metabolicznego czyli miejsca wiążące dla adaptorowych RNA (cząsteczek niosących i aktywujących metabolity). Metabolosomy mogły wiązać się z błoną fosfolipidową, powstającą samorzutnie w pierwotnym środowisku wodnym; proste białka mogły następnie tworzyć pory umożliwiające transport.

2. Powstawały zamknięte błoną lipidową komórki, następowało wzbogacanie zestawu aminokwasówe, wchodzących w skład białek. Te ostatnie stawały się coraz bardziej złożone strukturalnie i wiązały się z RNA, co wzmacniało i chroniło składniki RNowe. Składniki białkowe kompleksów rybonukleoproteinowych mogły także zwiększać specyficzność i szybkość reakcji.

3. Kolejnym etapem ewolucji mógł być wzrost zawartości białka w rybonukleoproteinach, stopniowa redukcja funkcji RNA, który został w wielu przypadkach sprowadzony do roli kofaktora nukleotydowego. Kod genetyczny, w którym zapisany był przebieg metabolizmu został zastąpiony kodem zawierającym informacje o syntezie białek. DNA przejął od RNA rolę materiału genetycznego.

Jest to tylko jedna z hipotez opisujących przebieg ewolucji. Dalsze badania zmuszą z pewnością do zmodyfikowania obecnych poglądów. Na pewno jednak wiedza o katalitycznych właściwościach cząsteczek RNA pozwala wyjaśnić wiele wątpliwości i otwiera tu nowe perspektywy, podobnie jak w wielu innych dziedzinach biologii.

Artykuł otrzymano 2 grudnia 1991 r.
Zaakceptowano do druku 25 marca 1992 r.

Piśmiennictwo

1. Kruger K, Grabowski PJ, Zaug AJ, Sand J., Gottschling DE, Cech TR (1982) *Cell* **31**: 147-157
2. Guerrier-Takada C, Gardiner KJ, Marsh TL, Pace NR, Altman S (1983) *Cell* **35**: 849-857
3. Cech TR (1988) *Gene* **73**: 259-271
4. Michel F, Umesono K, Ozeki H (1989) *Gene* **82**: 5-30
5. Symons RH (1989) *TIBS* **14**: 445-450
6. Forster AL, Symons RH (1987) *Cell* **49**: 211-220
7. Hampel A, Tritz R, Hicks M, Cruz P (1990) *Nucleic Acids Res* **18**: 299-304
8. Kuo MY-P, Sharmeen L, Dinter-Gottlieb G, Taylor J (1988) *J Virol* **62**: 4439-4444
9. Scaville BJ, Collins RA (1990) *Cell* **61**: 685-696
10. Van Toll H, Gross HJ (1988) *EMBO J* **8**: 293-300
11. Shedova TA, Korneeva GA, Otroshchenko VA, Venkstern TV (1987) *Nucleic Acids Res* **15**: 1745-1752
12. Dahlberg AE (1989) *Cell* **57**: 525-539
13. Guthrie C (1991) *Science* **253**: 157-163
14. Romero DP, Blackburn EH (1991) *Cell* **67**: 343-353
15. Bass B (1991) *Nature* **352**: 283-284
16. Simpson JR, Sullivan F, Behlen LS, DiRenzo AB, Uhlenbeck OC (1987) *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol* **52**: 267-276
17. Michel F, Hanna M, Green R, Bartel DP, Szostak JW (1989) *Nature* **342**: 391-395
18. Burke JM, Esherick JS, Burfeind WR, King JR (1990) *Nature* **344**: 80-82
19. Latham JA, Cech TR (1989) *Science* **245**: 276-282
20. Wu H-N, Lin Y-J, Lin F-P, Makino S, Chang M-F, Lai MMC (1988) *Proc Natl Acad Sci USA* **86**: 1831-1835
21. Smith JB, Dinter-Gottlieb G (1991) *Nucleic Acids Res* **19**: 1285-1289
22. Altman S, Baer M, Gold H, Guerrier-Takada C, Kirsebom L, Lawrence N, Lumelsky N, Vioque A (1987) W: Inouye M, Dudock BS (red) Molecular Biology of RNA, Academic Press, San Diego, California, str 3-15
23. Waugh DS, Green CJ, Pace NR (1989) *Science* **244**: 1569-1571
24. Altman S, Baer MF, Bartkiewicz M, Guerrier-Takada C, Kirsebom LA, Lumelsky N, Peck K (1989) *Gene* **82**: 63-64
25. Burgin AB, Pace NR (1990) *EMBO J* **9**: 4111-4118
26. Cech TR (1987) *Science* **236**: 1532-1539
27. Guerrier-Takada C, Haydock K, Allen L, Altman S (1986) *Biochemistry* **25**: 1509-1515
28. Grivell LA (1990) *Nature* **344**: 110-111
29. Cech TR (1986) *Cell* **44**: 207-210
30. Ruffner DE, Dahm SA, Uhlenbeck O (1989) *Gene* **82**: 31-41
31. Wu HN, Lai MMC (1989) *Science* **243**: 652-654
32. Pace NR, Bryan DJ, Reich C, Waugh DS, Olsen GJ, Marsh TL (1987) W: Inouye M, Dudock BS (red) Molecular Biology of RNA, Academic Press, San Diego, California, str 17-36
33. Forster AC, Altman S (1990) *Science* **249**: 783-785
34. Murphy FL, Cech TR (1989) *Proc Natl Acad Sci USA* **86**: 9218-9222
35. Herschlag D, Cech TR (1990) *Nature* **344**: 405-409
36. Robertson DL, Joyce GF (1990) *Nature* **344**: 467-477
37. Yang J-H, Perrault J-P, Labuda D, Usman N, Cedergren R (1990) *Biochemistry* **29**: 11156-11160
38. Been MD, Cech TR (1990) *Science* **239**: 1412-1415
39. Bartel DP, Doudna JA, Usman N, Szostak JW (1991) *Mol Cell Biol* **11**: 3390-3394
40. Doudna JA, Szostak JW (1989) *Nature* **339**: 519-522
41. Doudna JA, Couture S, Szostak JW (1991) *Science* **251**: 1605-1608
42. Mörl M, Schmelzer C (1990) *Nucleic Acids Res* **18**: 6545-6551
43. Haseloff J, Gerlach WL (1988) *Nature* **334**: 585-591
44. Lamb JW, Hay RT (1990) *J Gen Virol* **71**: 2257-2264
45. Rossi JJ, Sarver N (1990) *TIBTECH* **8**: 179-183
46. Saxena SK, Ackerman EJ (1990) *J Biol Chem* **265**: 17106-17109
47. Cotten M (1990) *TIBTECH* **8**: 174-178
48. Cameron FH, Jennings PA (1989) *Proc Natl Acad Sci USA* **86**: 9139-9143
49. Sarver N, Cantin EM, Chang PS, Zaia JA, Ladne PA, Stephanson DA, Rossi JJ (1990) *Science* **247**: 1222-1225
50. Sioud M, Drlica K (1991) *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 7303-7307
51. Gibson TJ, Lamond A (1990) *J Mol Evol* **30**: 7-15
52. Lamond AI, Gibson TJ (1990) *TIG* **6**: 145-149

http://rcin.org.pl

Zastosowanie reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR) w diagnostyce klinicznej

Application of the polymerase chain reaction in clinical diagnostics

RYSZARD SŁOMSKI[1]
HANNA CHLEBOWSKA[2]
JOCHEN REISS[3]

Spis treści:

I. **Wstęp**
II. **Zastosowanie PCR w diagnostyce klinicznej**
III. **Warianty PCR stosowane w diagnostyce**
IV. **Perspektywy wykorzystania PCR w przyszłości**

Contents:

I. **Introduction**
II. **Application of PCR in clinical diagnostics**
III. **PCR variants applied in diagnostics**
IV. **Future prospects of PCR application**

Wykaz stosowanych skrótów:
ASO — oligonukleotyd specyficzny dla allelu; RFLP — polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych; VNTR — tandemowe powtórzenia o dużej zmienności.

I. Wstęp

Reakcja łańcuchowa polimerazy (PCR) należy obecnie do najczęściej stosowanych technik w biologii molekularnej. Umożliwia uzyskiwanie milionów kopii specyficznego fragmentu DNA poprzez jego enzymatyczną amplifikację. Od opublikowania pionierskiej pracy Saiki i współautorów [1] o amplifikacji *in vitro* i analizie genomowych sekwencji β-globiny minęło już kilka lat lecz dopiero ostatnio PCR znalazła olbrzymie zastosowanie w praktyce. W piśmiennictwie naukowym przeważa zastosowanie PCR w diagnostyce klinicznej [2]. Podstawy i możliwości wykorzystania tej techniki zostały przedstawione czytelnikom *Postępów Biochemii* w artykule Jungerman i Słomskiego „Enzymatyczna amplifikacja DNA" [3]. Niepokojący jest prawie całkowity brak oryginalnych prac o stosowaniu PCR z ośrodków naukowych w naszym kraju. Do końca 1991 r. ukazało się zaledwie kilka prac (dane z systemu informacyjnego Medline). Autorzy niniejszej pracy zamierzają przedstawić zarówno aktualne możliwości stosowania PCR w diagnostyce klinicznej jak i te, które pojawią się w najbliższej przyszłości.

Technika PCR dokonała przełomu w diagnostyce klinicznej dlatego, że nie wymaga stosowania radioaktywnych izotopów, a ilość uzyskiwanego DNA jest wystarczająca do bezpośredniej obserwacji i oceny podczas rozdziałów elektroforetycznych. W celach diagnostycznych wykonuje się przeciętnie 35 cykli PCR obejmujących denuturację dwuniciowego DNA, przyłączenie oligonukleotydów (tzw. primerów) i syntezę. Początkowo w etapie syntezy stosowano termolabilną polimerazę Klenowa, co wymagało dodawania świeżego enzymu każdorazowo po denaturacji. Często w reakcji powstawały niespecyficzne produkty, gdyż temperatura syntezy ograniczona była do 37°C i dochodziło do niespecyficznego wiązania primerów [4]. Wprowadzenie termostabilnej polimerazy z bakterii *Thermus aquaticus* (polimeraza Taq) [5] w znaczący sposób uprościło reakcję amplifikacji, obniżyło jej koszty oraz przyczyniło się do szybkiego zastosowania tej reakcji w biologii i medycynie. Obecnie na rynku dostępna jest liczna grupa polimeraz z termofilnych Prokaryota, nie zmieniających swej aktywności w podwyższonych temperaturach.

II. Zastosowanie PCR w diagnostyce klinicznej

W początkowym okresie PCR wykonywano manualnie, przenosząc probówki reakcyjne do łaźni wodnych o określonych temperaturach. Wstępna automatyzacja PCR polegała na adaptacji robotów laboratoryjnych do przenoszenia próbek. W krótkim czasie pojawiło się wiele specjalistycznych urządzeń, tzw.

[1] Prof. dr hab., [2] mgr, [3] dr, Zakład Genetyki Człowieka PAN, 60-479 Poznań, ul. Strzeszyńska 32, Institut für Humangenetik der Universität, Gosslerstr. 12 D, 3400 Göttingen, RFN.

http://rcin.org.pl

Tabela 1.
Zastosowanie techniki PCR w diagnostyce klinicznej

Gen/genom	Choroba/zastosowanie	Piśmiennictwo
I. Geny człowieka		
α-N-acetylogalaktozoaminidaza	Choroba Schindlera	[52]
α-1-antytrypsyna	Niedobór	[53, 54, 55, 56]
Aminotransferaza alaniny	Hiperoksaluria typ I	[57]
Amyloid	Choroba Alzheimera	[58]
Antygeny HLA	Typowanie dawców	[59, 60]
Aromataza	Rak sutka	[61]
β-globina	Hemoglobinopatie	[62]
CFTR	Mukowiscydoza	[31, 63, 64, 65]
Cytochrom P450IA1	Podatność na nowotwory	[66]
Czynnik VIII krzepnięcia	Hemofilia A	[67]
Czynnik IX krzepnięcia	Hemofilia B	[68]
Czynnik von Willebrandta	Choroba von Willebrandta	[69]
Dehydrogenaza NADH	Zapalenie siatkówki i nerwu wzrokowego	[70]
DMD	Dystrofia mięśniowa Duchenne'a	[11, 27, 28, 29]
Fosforybozylotransferaza hipoksantyna/guanina	Zespół Lesh-Nyhana	[71]
Fosforybozylotransferaza adeniny	Niedobór enzymu	[72]
Gen Ras	Ostra białaczka szpiku	[73, 76]
Heksozaminidaza A	Choroba Tay-Sachsa	[59, 60]
IgG (łańcuch ciężki VDJ)	Chłoniak	[75, 76]
Kwaśna β-glukozydaza	Choroba Gauchera	[77]
Receptor LDL	Hipercholesterolemia	[78]
Receptor δ komórek T	Choroba MRD	[79, 80]
Translokacja t(1;19)(q23;p13)	Ostra białaczka limfoblastyczna	[81, 82]
Translokacja t(14;18)	Transplantacja szpiku	[83]
tRNA(Lys)	Mioklonia	[84]
II. Mikroorganizmy		
Adenowirus	Nieżyt jelit	[85]
Aeromonas	Biegunka	[86]
Borrelia recurrentis	Dur powrotny	[87]
Clostridium difficile	Biegunka, zapalenie jelit	[88]
Cytomegalowirus	Transplantacja szpiku	[89]
Legionella pneumofila	Zapalenie płuc	[13]
Papillomawirus	Brodawczak	[13]
Rikettsia tsutsugamushi	Choroba tsutsugamushi	[90]
Treponema pallidum	Kiła	[91, 92]
Trypanosoma cruzzi	Choroba Chagasa	[13]
Wirus Epstein-Barr	Chłoniak	[93]
Wirus Hepatitis B	Rak wątrobowo-komórkowy	[94]
Wirus Hepatitis C	Przewlekłe zapalenie wątroby	[96-98]
Wirus Herpes simplex	Opryszczka warg	[99]
Wirus HIV-1	Brak odporności immunologicznej	[100-104]

Informacje o zastosowaniu techniki PCR w diagnostyce klinicznej, które ukazały się do 1991 roku znajdzie czytelnik w opracowaniu Reissa i Coopera [2].

thermocyclers. Zapewniają one właściwą temperaturę i czas kolejnych etapów reakcji, przy czym próbki pozostają przez cały czas w bloku reakcyjnym. Bardzo istotna (np. dla sekwencjonowania produktów PCR) jest możliwość precyzyjnego doboru czasu trwania reakcji, jak również zmiany czasu syntezy w kolejnych cyklach i ochładzanie próbek po zakończeniu reakcji.

Najprostszym zastosowaniem reakcji PCR w diagnostyce medycznej jest wykazanie obecności lub nieobecności specyficznego fragmentu DNA. Niezwykle duża czułość metody powoduje, że w warunkach suboptymalnych może dojść do amplifikacji niespecyficznego fragmentu. Dla uzyskania właściwego produktu konieczna jest również ściśle określona ilość poszczególnych substratów oraz doświadczalnie ustalone warunki reakcji. Nieodzowne jest również przygotowanie wspólnej mieszaniny reakcyjnej dla poszczególnych próbek DNA i przeprowadzanie reakcji w obecności pozytywnej i negatywnej próby kontrolnej. Kolejne zalecenie dotyczy oddzielnych stanowisk pracy (najlepiej wyłączonego pomieszczenia) dla wykonywania PCR oraz stosowania urządzeń laboratoryjnych (przede wszystkim mikropipet) przeznaczonych wyłącznie do tej reakcji [6]. Należy również pamiętać o większej w porównaniu z enzymem Klenowa możliwości pojawienia się błędu replikacji przy zastosowaniu polimerazy Taq [7], dlatego nie można dla celów diagnostycznych stosować zbyt małej ilości wyjściowego DNA [8], chociaż możliwa jest amplifikacja DNA pojedynczej komórki [9]. Niedopuszczalne jest przechowywanie produktów PCR w bezpośrednim sąsiedztwie banku DNA lub klonów DNA,

http://rcin.org.pl

gdyż nieuchronnie doprowadzi to do zanieczyszczenia DNA.

Wykazanie obecności lub braku produktu PCR znalazło zastosowanie w wykrywaniu delecji powodujących występowanie chorób dziedzicznych u hemizygotycznych pacjentów, np. z dystrofią mięśniową Duchenne'a lub Beckera [10, 11], w licznych testach na obecność wirusa HIV [12], *Hepatitis B*, *Papillomavirus*, *Legionella pneumophila* i *Trypanosoma cruzi* [13]. Przy wykrywaniu nosicielstwa chorób genetycznych wyłania się problem pomiaru ilości zamplifikowanego DNA. Opisano szereg podejść badawczych, jednak nie wydaje się by znalazły one zastosowanie w rutynowych badaniach diagnostycznych [14, 15, 16]. W przypadku diagnostyki prenatalnej chorób genetycznych konieczna była ocena błędu wywołanego zanieczyszczeniem genomu płodu przez komórki matki. Wydaje się, że nie ma ono wpływu na wiarygodność badań, pod warunkiem, że stopień zanieczyszczenia nie jest zbyt wysoki, a doświadczenia są przeprowadzane z nieodzowną dokładnością [17, 19].

Drugim najważniejszym zastosowaniem PCR w diagnostyce jest wykorzystanie tej techniki do uzyskania zwiększonej ilości DNA przed jego dalszą analizą. W badaniach chorób związanych z polimorfizmem długości fragmentów restrykcyjnych (RFLP) do niedawna posługiwano się wyłącznie metodą *Southern blotting* i hybrydyzacją z radioaktywnymi sondami molekularnymi, przy czym wynik uzyskiwano dopiero po tygodniu. Technika PCR zastępuje metodę *Southern blotting* i jest już rutynowo stosowana do wykrywania polimorfizmu DNA charakterystycznego dla wielu chorób genetycznych, m.in. anemii sierpowatej, niedoboru α-1-antytrypsyny, hemofilii i dystrofii mięśniowej Duchenne'a [2].

Klasycznym przykładem postępu jaki nastąpił w bezpośredniej diagnostyce DNA przy pomocy PCR jest jedna z najczęstszych chorób genetycznych — mukowiscydoza. Stosując metodę PCR, Williams i współautorzy już w 1988 r. przeprowadzili pełną diagnostykę tej choroby w ciągu jednego dnia [19]. Szybkie zgromadzenie danych z różnych krajów, o typach i częstości mutacji genu CFTR (genu odpowiedzialnego za występowanie mukowiscydozy), wkrótce po sklonowaniu genu [20], byłoby niemożliwe bez techniki PCR. W większości tych badań potwierdzono już zidentyfikowaną mutację. Obecnie stosuje się PCR celem wykrycia nieznanych jeszcze mutacji w połączeniu z takimi technikami jak bezpośrednie sekwencjonowanie jednoniciowego produktu PCR (asymetryczna PCR) [21], niesparowanie chemiczne (ang. *chemical mismatch*) [22, 23], polimorfizm konformacyjny jednoniciowego DNA (ang. *single-stranded conformational polymorphism*, SSCP) [24] i denaturującą elektoforezę (w żelu) gradientową (ang. *denaturing gradient gel electrophoresis*, DGGE) [25].

Identyfikacja nie znanych jeszcze mutacji, prowadzących do stanów chorobowych może być znacznie uproszczona przez zastąpienie używanego do analizy genomowego DNA przez mRNA. Ukazały się już doniesienia o wykrywaniu delecji i ustalaniu nosicielstwa dystrofii mięśniowej Duchenne'a poprzez analizę mRNA limfocytów krwi obwodowej, z wykorzystaniem zjawiska nieuprawnionej transkrypcji (ang. *illegitimate transcription*) wykazanej po raz pierwszy przez Chelly'ego i współautorów [26]. Stosując jako materiał wyjściowy całkowity RNA limfocytów przeprowadzono syntezę cDNA stosując primery specyficzne dla genu DMD, a następnie dwie reakcje PCR z wewnętrznymi primerami (ang. *nested* PCR). Ukazało się już kilka doniesień o zastosowaniu tej metody nie tylko do analizy patologicznych transkryptów, lecz również do ustalania nosicielstwa dystrofii [27, 28, 29]. Szczególnie cenne jest bezpośrednie ustalenie nosicielstwa, gdyż próby ustalenia nosicielstwa metodą hybrydyzacji z sondami cDNA, metodą PCR lub poprzez analizę sprzężeń nie dają informatywnych wyników w wielu przypadkach osób z rodzin z ryzykiem DMD. Wykorzystanie łatwo dostępnych limfocytów z krwi obwodowej jako źródła rzadkich transkryptów przedstawiono w pracy, w której transkrypty specyficzne dla spermatogenezy u człowieka wykryto w limfocytach nie tylko mężczyzn, ale i kobiet [30]. Bezpośrednia analiza transkryptów metodą PCR przyczyniła się również do wykrycia alternatywnego *splicingu* genu CFTR [31].

PCR może być również zastosowana do wykrywania translokacji specyficznych dla nowotworów w mRNA lub genomowym DNA. Najwcześniej zastosowano PCR w diagnostyce białaczek limfoblastycznych. Markerem cytogenetycznym tych białaczek jest występowanie chromosomu *Philadelphia*, natomiast na poziomie molekularnym dochodzi do fuzji genu BCR na chromosomie 22 z genem ABL na chromosomie 9 i powstawania chimerycznej formy mRNA i białka. Gdy fuzji towarzyszy rearanżacja genu BCR dochodzi do chronicznej białaczki myeloblastycznej (CML), a gdy nie występuje rearanżacja dochodzi do ostrej białaczki limfoblastycznej (ALL). mRNA BCR-ABL mogą być poddane odwrotnej transkrypcji i analizowane metodą PCR [32], a uzyskane wyniki wykorzystywane do śledzenia przebiegu terapii [33]. Znaczenie tego postępowania wzrosło jeszcze bardziej po wykryciu mRNA BCR-ABL u pacjentów, których kariotyp nie wykazywał obecności chromosomu *Philadelphia* (34).

PCR jest stosowana coraz częściej do wykrywania mRNA specyficznych dla nowotworów, a także oceny ich ekspresji i rearanżacji. Olbrzymie znaczenie PCR dla oceny leczenia pacjentów wykazano ostatnio w badaniach mutacji genu supresorowego p53 w nowotworach pęcherza i dróg moczowych [35]. Opisano także szereg mutacji punktowych powodujących alternatywny *splicing* tego genu w nowotworach płuc [36] i szyjki macicy [37].

http://rcin.org.pl

III. Rodzaje PCR stosowane w diagnostyce

Ostatnio pojawiło się w piśmiennictwie naukowym bardzo wiele doniesień o wariantach PCR. Wydano również pierwsze opracowania książkowe [38]. Spośród wielu nowych wariantów PCR jedynie nieliczne znalazły szersze zastosowanie w praktyce. Autorzy niniejszego opracowania przygotowując corocznie specjalistyczne kursy z zakresu biologii molekularnej wypróbowali wiele nowych wariantów PCR i zalecają dużą ostrożność w ich wdrażaniu. Przede wszystkim uwaga ta dotyczy substancji dodawanych do mieszaniny reakcyjnej celem podwyższenia wydajności i specyficzności reakcji (np. DMSO, BSA, gp32), które w przypadkach różnych amplifikowanych sekwencji mogą mieć pozytywny lub negatywny wpływ.

Jak już wspomniano, PCR, podobnie jak metoda *Southern blotting* może być zastosowana w badaniach polimorfizmu DNA. Produkty PCR trawi się w tym celu enzymami restrykcyjnymi. Jeśli nie można użyć enzymu restrykcyjnego ze względu na brak miejsca rozpoznawania, przeprowadza się hybrydyzację z oligonukleotydami specyficznymi dla allelu (ASO). W obydwu przypadkach analiza może być uproszczona przez bezpośrednie zastosowanie techniki PCR specyficznej dla allelu. Dochodzi wówczas do wybiórczej amplifikacji konkretnego allelu i w ten sposób jedna reakcja umożliwia zarówno rozróżnienie alleli jak i amplifikację DNA [39, 40].

Polimorfizm DNA wykrywany poprzez PCR zastosowano do ustalania nosicielstwa zmutowanego genu w rodzinach z ryzykiem wystąpienia najczęstszych chorób genetycznych — mukowiscydozy i dystrofii mięśniowej. W przypadku dystrofii mięśniowej wykorzystano naturalny polimorfizm regionu pERT genu DMD, oceniany poprzez trawienie uzyskanych produktów PCR endonukleazami Xmn I, Bam HI i Taq I [41].

Na potrzeby diagnostyki klinicznej opracowano wariant PCR umożliwiający jednoczesną amplifikację kilku fragmentów DNA. Po raz pierwszy ten wariant PCR (*multiplex*) zastosowano w badaniach największego dotąd poznanego genu człowieka (gen DMD). W pionierskiej pracy Chamberlaina i współautorów [10] reakcja *multiplex* obejmowała sześć eksonów w regionach genu DMD, w których najczęściej występują delecje prowadzące do dystrofii. Pojedynczą PCR można było wykryć ok. 60% wszystkich delecji. Nic dziwnego, że ta reakcja znalazła natychmiastowe zastosowanie w diagnostyce. Wkrótce reakcją *multiplex* objęto jeszcze trzy eksony, a wykrywalność delecji wzrosła do 80%. Ostatnio Beggs i współautorzy włączyli do reakcji *multiplex* jeszcze 9 eksonów i region promotora genu, zwiększając w ten sposób wykrywalność delecji do 98% [11]. Autorzy niniejszego opracowania metodą PCR analizują 20 regionów genu DMD — region promotora i eksony 3, 4, 6, 8, 12, 13, 17, 19, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52 i 60, wykonując 6 reakcji typu *multiplex*.

Głównym ograniczeniem standardowej PCR jest wymóg znajomości sekwencji ograniczającej odcinek DNA przeznaczony do amplifikacji, niezbędny do syntezy primerów. Ten problem można wyeliminować przy pomocy tzw. odwrotnej PCR (ang. *inverted* PCR) [42, 43]. PCR próbowano zastosować do amplifikacji sekwencji DNA, dla której znany był tylko jeden specyficzny primer, a uniwersalny fragment, zawierający sekwencję komplementarną do drugiego primera przyłączono przed amplifikacją do końca 3′ badanego fragmentu. Z tą techniką wiązano duże nadzieje na szybkie wykrywanie niepoznanych dotąd mutacji [44]. Własne obserwacje sugerują, że ta technika nie znajduje większego zastosowania w badaniach DNA Eukaryota, zwłaszcza genomu człowieka. Bardziej obiecująca wydaje się być inna wersja tzw. zakotwiczona PCR (ang. *anchored* PCR), w której koniec 3′ amplifikowanej sekwencji wydłuża się przez dołączenie homopolimeru z zastosowaniem terminalnej transferazy, a następnie przeprowadza się amplifikację w obecności primera specyficznego do końca 5′ i dwóch primerów współdziałających z homopolimerem [45].

IV. Perspektywy wykorzystania techniki PCR w przyszłości

W piśmiennictwie naukowym pojawiają się doniesienia o nowych możliwościach zastosowania PCR w diagnostyce klinicznej. Spektakularnym przykładem może być tworzenie nowych, sztucznych miejsc restrykcyjnych umożliwiających wykrywanie mutacji punktowych. To nowe podejście metodyczne znalazło już zastosowanie w diagnostyce mukowiscydozy i fenyloketonurii, będąc znacznie tańszym od sekwencjonowania.

Charakterystyczną cechą wielu chorób człowieka jest występowanie mutacji w określonych regionach genów. Opisano np. kilka mutacji wywołujących mukowiscydozę, które występują w tych samych eksonach. Rutynowym podejściem jest w takich przypadkach sekwencjonowanie całych eksonów, celem wykrycia wszystkich mutacji. Najczęściej przeprowadza się amplifikację eksonu a następnie reamplifikację stosując wewnętrzny primer (ang. *nested primer*) przedłużony na końcu 5′ o sekwencję komplementarną do primera sekwencyjnego faga M13. Przeprowadzenie PCR w obecności primerów w różnych proporcjach stężeń (np. 50 : 1, tzw. asymetryczna PCR) prowadzi do nagromadzenia jednoniciowego fragmentu, który można następnie sekwencjonować stosując primer M13. Asymetryczna wersja PCR doprowadziła do opracowania uniwersalnych primerów M13 zawierających znaczniki fluorescenycjne i konstrukcji pierwszych półautomatycznych urządzeń do sekwencjonowania. Oznacza to całkowite zaprzestanie prac z radioaktywnymi izotopami.

http://rcin.org.pl

Metoda PCR znajdzie na pewno szersze zastosowanie w medycynie sądowej i kryminalistyce [46, 47], gdyż umożliwia ustalanie ojcostwa i identyfikację śladów biologicznych. W tym celu przeprowadza się amplifikację regionów DNA charakteryzujących się w populacji znacznym polimorfizmem [48]. Opisano już kilka regionów wykazujących polimorfizm długości wynikający z zawartości różnej liczby krótkich, tandemowych powtórzeń (ang. *variable number tandem repeats*, VNTR). Znając częstość występowania alleli w populacji można obliczyć prawdopodobieństwo pokrewieństwa, co w zasadniczy sposób różni tę technikę od analizy typu *multilocus*, składającej się na tzw. DNA *fingerprinting*. Dokładność oznaczeń poprzez analizę VNTR zbliżona jest do 100%. Olbrzymie znaczenie ma również możliwość wykonania analizy na materiale częściowo zdegradowanym lub dostępnym jedynie w śladowych ilościach.

W porównaniu z innymi technikami, PCR jest stosunkowo prostą techniką, należy jednak pamiętać, że wyniki uzyskiwane przy pomocy PCR dla diagnostyki klinicznej powinny być interpretowane wyłącznie przez doświadczone osoby, znające ujemne strony tej techniki. Nieprzekonywujące wydaje się np. wykrywanie specyficznych sekwencji chromosomu Y w krwi obwodowej ciężarnych kobiet (gdy płód był męski) [49]. Dążenie do analizy pojedynczych kopii DNA spowodowało, że ponownie zwrócono uwagę na błędy mogące wystąpić podczas replikacji. Krawczak i współautorzy [8] oszacowali poziom błędu analizy pojedynczej kopii na 1%. Metodę PCR zastosowano z powodzeniem do diagnostyki preimplantacyjnej, w której, po przeprowadzeniu zapłodnienia *in vitro*, pobiera się z 8-komórkowego stadium zygoty 2 komórki i w ciągu kilku godzin wykonuje się na jednej komórce analizę cytogenetyczną, a na drugiej molekularną najczęstszych aberracji chromosomowych i chorób genetycznych [50]. Badania preimplantacyjne są już wykonywane w Wielkiej Brytanii i w 1991 r. umożliwiły urodzenie kilkunastu zdrowych dzieci w rodzinach z wysokim ryzykiem wystąpienia ciężkich chorób genetycznych [51]. W wielu krajach diagnostyka preimplantacyjna regulowana jest prawem lub normami etycznymi.

Artykuł otrzymano 10 lutego 1992 r.
Zaakceptowano do druku 18 lutego 1992 r.

Piśmiennictwo

1. **Saiki RK, Scharf S, Faloona F et al. (1985)** *Science* **230**: 1350-1354
2. Reiss J, Cooper DN. (1990) *Hum Genet* **85**: 1-8
3. Jungerman M, Słomski R (1990) *Post Biochem* **36**: 14-21
4. Słomski R, Jungerman M, Kraszewski A, Horst-Sikorska W (1989) *Biotechnologia* **2**: 74-84
5. Chien A, Edgar DB, Trela JM. (1976) *J Bacteriol* **127**: 1550-1557
6. Orrego C. (1990) W: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, (red.) PCR protocols: A guide to methods and applications. San Diego: Academic Press, Inc., str 447-454
7. Tindall KR, Kunkel TA. (1989) *Biochem* **27**: 6008-6013
8. Krawczak M, Reiss J, Schmidtke J, Rsler U (1989) *Nucleic Acids Res* **17**: 2197-2201
9. Li H, Gyllenstein UB, Cui X, Saiki RK, Erlich HA, Arnheim N. (1988) *Nature* **335**: 414-417
10. Chamberlain JS, Gibbs RA, Ranier JR, Nguyen PN, Caskey CT. (1988) *Nucleic Acids Res* **23**: 11141-11156
11. Beggs AH, Koenig M, Boyce FM, Kunkel LM (1990) *Hum Genet* **86**: 45-48
12. Kellogg DE, Kwok S. (1990) W: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, (red) PCR protocols: A guide to methods and applications. San Diego: Academic Press, Inc. str 337-347
13. Eisenstein BI. (1990) *N Engl J Med* **322**: 178-183
14. Chelly J, Kaplan JC, Maire P, Gautron S, Kahn A. (1988) *Nature* **333**: 858-860
15. Gilliland G, Perrin S, Blanchard K, Bunn HF. (1990) *Proc Natl Acad Sci USA* **87**: 2725-2729
16. Gaudette MF, Crain WR (1991) *Nucleic Acids Res* **19**: 1879-1884
17. Kogan SC, Doherty M, Gitschier J. (1987) *New Engl J Med* **317**: 985-990
18. Hentemann M, Reiss J, Wagner M, Cooper DN (1990) *Hum Genet* **84**: 228-232
19. Williams C, Williamson R, Coutelle C, Loeffler F, Smith J, Ivinson A (1988) *Lancet* **11**: 102-103
20. Riordan JR, Rommens JM, Kerem BS et al. (1989) *Science* **245**: 1066-1073
21. Gyllensten UB, Erlich HA. (1988) *Proc Natl Acad Sci USA* **85**: 7652-7656
22. Montandon AJ, Green PM, Gianelli F, Bentley DR. (1989) *Nucleic Acis Res* **17**: 3347-3358
23. Grompe M, Muzny DM, Caskey CT. (1989) *Proc Natl Acad Sci USA* **86**: 5888-5892
24. Orita M, Suzuki Y, Sekiya T, Hayashi K (1989) *Genomics* **5**: 874-879
25. Saris JJ, Breunig MH, Dauwerse HG, Snijdewint FGM, Tope B, Fodde R, van Ommen GJB (1990) *Lancet* **1**: 1102-1103
26. Chelly J, Concordet JP, Kaplan JC, Kahn A. (1989) *Proc Natl Acad Sci USA* **86**: 2617-2621
27. Roberts RG, Bentley DR, Barby TFM, Manners E, Bobrow M (1990) *Lancet* **336**: 1523-1526
28. Schloesser M, Slomski R, Wagner M, Reiss J, Berg L-P, Kakkar VV, Cooper DN (1990) *Mol Biol Med* **7**: 519-523
29. Roberts RG, Barby TFM, Manners E, Bobrow M, Bentley DR (1981) *Am J Hum Genet* **49**: 298-330
30. Słomski R, Schloesser M, Chlebowska H, Reiss J, Engel W. (1991) *Hum Genet* **87**: 307-310
31. Słomski R, Schlosser M, Berg L-P, Wagner M, Kakkar VV, Cooper DN, Reiss J (1992) *Hum Genet* (w druku)
32. Hooberman AL, Carrino JJ, Leibowitz D, Rowley JD, Le-Beau MM, Arlin ZA, Westbrook CA (1989) *Proc Natl Acad Sci USA* **86**: 4259-4263
33. Lange W, Snyder DS, Castro R, Rossi JJ, Blume KG (1989) *Blood* **73**: 1735-1741
34. Smadia M, Alimena G, Goudsmit R, Grosveld G, Hagemeijer A (1989) *Blood* **73**: 1038-1044
35. Sidransky D, Eschenbach A, Tsai YC et al. (1991) *Science* **252**: 706-709
36. Takahashi T, D'Amico D, Chiba I, Buchhagen DL, Minna JD (1990) *J Clin Invest* **86**: 363-369
37. Crook T, Wrede D, Vousden KH (1991) *Oncogene* **6**: 873-875
38. Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (1990) PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Academic Press, San Diego
39. Wu DY, Ugolozzi L, Pal BK, Wallace RB. (1989) *Proc Natl Acad Sci USA* **86**: 2757-2760
40. Newton CR, Graham A, Heptinstall LE et al. (1989) *Nucleic Acids Res* **17**: 2503-2516
41. Roberts RG, Cole CG, Hart KA, Bobrow M, Bentley DR (1989) *Nucleic Acids Res* **17**: 811
42. Ochman H, Gerber AS, Hartl DL. (1988) *Genetics* **120**: 621-623

http://rcin.org.pl

43. Triglia T, Peterson MG, Kemp DJ. (1988) *Nucleic Acids Res* **16**: 8186
44. Fors L, Saavedra RA, Hood L. (1990) *Nucleic Acids Res* **18**: 2793-2799
45. Loh EY, Elliot JF, Cwirla S et al. (1989) *Science* **243**: 217-220
46. Jeffreys AJ, Wilson V, Neumann R, Keyte J. (1988) *Nucleic Acids Res* **16**: 10953-10971
47. Higuchi R, Beroldingen CH, Sensabaugh GF, Erlich HA (1988) *Nature* **332**: 543-546
48. Kasai K, Nakamura Y, White R (1990) *Journal of Forensic Sciences* **35**: 1196-1200
49. Lo YMD, Patel P, Wainscoat JS, Sampietro M, Gillmer MDG, Fleming KA. (1989) *Lancet* **11**: 1363-1365
50. Handyside AH, Penketh RJA, Winston RML et al. (1989) *Lancet* **11**: 347-349
51. Nandyside AH (1991) Materiały Zjazdu Fertilität und Sterilität, Goslar, RFN
52. Wang AM, Schindler D, Desnick R. (1990) *J Clin Invest* **86**: 1752-1756
53. Poller W, Faber JP, Olek K. (1990) *Klin Wochenscher* **68**: 857-863
54. Brind AM, McIntosh I, Brock DJ, James OF, Bassendine MF (1990) *J-Hepatol.* **10**: 240-243
55. Verlinsky Y, Ginsberg N, Lifchez A, Valle J, Moise J, Strom CM. (1990) *Hum Reprod* **5**: 826-829
56. Poller W, Faber JP, Olek K. (1990) *Klin Wochenschr* **68**: 857-863
57. Purdue PE, Takada Y, Danpure CJ. (1990) *J Cell Biol* **111**: 2341-2351
58. Gardella JE, Ghiso J, Gorgone GA, Marratta D, Kaplan AP, Frangione B, Gorevic PD. (1990) *Biochem Biophys Res Commun* **173**: 1292-1298
59. Tiercy JM, Jeannet M, Mach B. (1990) *Blood-Rev* **4**: 9-15
60. Wordsworth BP, Allsopp CE, Young RP, Bell JI. (1990) *Immunogenetics* **32**: 413-418
61. Brodie AM, Banks PK, Inkster SE, Son C, Koos RD. (1990) *J Steroid Biochem Mol Biol* **37**: 1043-1048
62. Kaufman DL, Ramesh V, McClatchey AI, Menkes JH, Tobin AJ. (1990) *Genomics* **8**: 656-663
63. Cutting GR, Kash LM, Rosenstein BJ, Zielenski J, Tsui L-C, Antonarakis SE, Kazazian HH. (1990) *Nature* **346**: 366-369
64. Cystic Fibrosis Genetic Analysis Consortium (1990) *Am J Hum Genet* **47**: 345-359
65. Chu C-S, Trapnell BC, Murtagh Jr JJ, Moss J, Dalemans W, Jallat S, Mercenier A, Pavirani A, Lecocq J-P, Cutting GR, Guggino WB, Crystal R. (1991) *EMBO J* **10**: 1355-1363
66. Omiecinski CJ, Redlich CA, Costa P. (1990) *Cancer Res* **50**: 4315-4321
67. Sadler JE. (1990) *Semin Thromb Hemost* **16**: 341-347
68. Rao KJ, Lyman G, Hamsbhushanam K, Scott JP, Jagadeeswaran P. (1990) *Mol Cell Probes* **4**: 335-340
69. Peake IR, Bowen D, Bignell P, Liddell MB, Sadle G, Bloom AL. (1990) *Blood* **76**: 555-561
70. Huoponen K, Vilkki J, Savontaus ML, Aula P, Nikoskelainen EK. (1990) *Genomics* **8**: 583-585
71. Rossi AM, Thijssen JC, Tates AD, Vrieling H, Natarajan AT, Lohman PH, van Zeeland AA. (1990) *Mutat Res* **244**: 353-357
72. Mimori A, Hidaka Y, Wu VC, Tarle SA, Kamatani N, Kelley WN, Pallela TD. (1991) *Am J Hum Genet* **48**: 103-107
73. Mane SM, Meltzer SJ, Gutheil JC, Kapil V, Lee EJ, Needleman SW. (1990) *Genes Chromosom* **2**: 71-77
74. Shibata D, Capella G, Perucho M. (1990) *Baillieres Clin Gastroenterol* **4**: 151-169
75. Wan JH, Trainor KJ, Brisco MJ, Morley AA. (1990) *J Clin Pathol* **43**: 888-890
76. Jonsson OG, Kitchens RL, Scott FC, Smith RG. (1990) *Blood* **76**: 2072-2079
77. Latham TE, Theophilus BD, Grabowski GA, Smith FI. (1991) *DNA Cell Biol* **10**: 15-21
78. Benlian P, Amselem S, Loux N, Pastier D, Giraud G, de Gennes JL, Turpin G, Monnier L, Rieu D, Douste Blazy P, et al. (1990) *Ann Genet* **33**: 65-69
79. Yokota S, Hansen Hagge TE, Ludwig WD, Reiter A, Raghavachar A, Kleihauer E, Bartram CR. (1991) *Blood* **77**: 331-339
80. Macintyre EA, d'Auriol L, Duparc N, Leverger G, Galibert F, Sigaux F. (1990) *J Clin Invest* **86**: 2125-2135
81. Hunger SP, Galili N, Carroll AJ, Crist WM, Link MP, Cleary ML. (1991) *Blood* **77**: 687-693
82. Hooberman AL, Westbrook CA. (1990) *Clin Lab Med* **10**: 839-855
83. Negrin RS, Kiem HP, Schmidt Wolf IG, Blume KG, Cleary ML. (1991) *Blood* **17**: 654-660
84. Seibel P, Degoul F, Romero N, Marsac C, Kadenbach B. (1990) *Biochem Biophys Res Commum* **173**: 561-565
85. Allard A, Girones R, Juto P, Wadell G. (1990) *J Clin Microbiol* **28**: 2659-2667
86. Pollard DR, Johnson WM, Lior H, Tyler SD, Rozee KR. (1990) *J Clin Microbiol* **28**: 2477-2481
87. Goodman JL, Jurkovich P, Kramber JM, Johnson RC. (1991) *Infect Immun* **59**: 269-278
88. Kato N, Ou CY, Kato H, Bartley SL, Brown VK, Dowell VR Jr, Ueno K. (1991) *J Clin Microbiol* **29**: 33-37
89. Einsele H, Steidle M, Vallbracht A, Saal JG, Ehninger G, Muller CA. (1990) *Blood* **77**: 1104-1110
90. Kelly DJ, Marana DP, Stover CK, Oaks EV, Carl M. (1990) *Ann NY Acad Sci* **590**: 564-571
91. Burstain JM, Grimprel E, Lukehart SA, Norgard MV, Radolf JD. (1991) *J Clin Microbiol* **29**: 62-69
92. Hay PE, Clarke JR, Taylor-Robinson D, Goldmeier D. (1990) *Genitourin Med* **66**: 428-432
93. Rouah E, Rogers BB, Wilson DR, Kirkpatrick JB, Buffone GJ. (1990) *Hum Pathol* **21**: 545-550
94. Brown JL, Carman WF, Thomas HC. (1990) *Baillieres Clin Gastroenterol* **4**: 721-747
95. Ulrich PP, Bhat RA, Kelly I, Brunetto MR, Bonino F, Vyas GN. (1990) *J Med Virol* **32**: 109-118
96. Kato N, Yokosuka O, Omata M, Hosoda K, Ohto M. (1990) *J Clin Invest* **86**: 1764-1767
97. Ulrich PP, Romeo JM, Lane PK, Kelly I, Daniel LJ, Vyas GN. (1990) *J Clin Invest* **86**: 1609-1614
98. Garson JA, Tuke PW, Makris M, Briggs M, Machin SJ, Preston FE, Tedder RS. (1990) *Lancet* **336**: 1022-1025
99. Kimura H, Shibata M, Kuzushima K, Nishikawa K, Nishiyama Y, Morishima T. (1990) *Med Microbiol Immunol Berl* **179**: 177-184
100. Sheppard HW, Ascher MS, Busch MP, Sohmer PR, Stanley M, Luce MC, Chimera JA, Madej R, Rodgers GC, Lynch C, et al. (1991) *J Acquir Immune Defic Syndr* **4**: 277-283
101. Escaich S, Wallon M, Baginski I, Ritter J, Philippe N, Bertrand Y, Claris O, Raudrant D, Sepetjan M, Trepo C. (1991) *J Acquir Immune Defic Syndr* **4**: 130-135
102. Rakusan TA, Rarrott RH, Sever JL. (1991) *J Acquir Immune Defic Syndr* **4**: 116-121
103. Lyman WD, Kress Y, Kure K, Rashbaum WK, Rubinstein A, Soeiro R. (1990) *AIDS* **4**: 917-920
104. Karpas A, Hewlett IK, Hill F, Gray J, Byron N, Gilgen D, Bally V, Oates JK, Gazzard B, Epstein JE. (1990) *Proc Natl Acad Sci USA* **87**: 7613-7617

International Symposium on Stability and Stabilizator of Enzymes,
Maastricht, The Netherlands,
22—25 November 1992
Info: Dr W J J van den Tweel,
DSM Research, P O B 18,
6160 DM Geleen, The Netherlands.

http://rcin.org.pl

Słownictwo glikoprotein, glikopeptydów i peptydoglikanów

Opracowano na podstawie dokumentu Wspólnej Komisji IUPAC-IUB Nomenklatury Biochemicznej (JCBN): „*Nomenclature of glycoproteins, glycopeptides and peptidoglycans. Recommendations 1985*", naszkicowanego przez Nathana Sharona z Weitzmann Institute of Science, Rehovot, Izrael i opublikowanego w *Eur. J. Biochem.* (1986), **159**, 1-6 oraz w innych czasopismach.

Opracował Andrzej Gamian

Komisja Słownictwa Biochemicznego dziękuje prof. dr Januszowi Sokołowskiemu za konsultację i pomoc w opracowaniu dokumentu

Spis treści:

1. Wstęp
2. Słownictwo
2.1. Glikoproteiny, proteoglikany i glikozoaminoglikany
2.2. Glikopeptydy, glikoaminokwasy i glikozyloaminokwasy
2.3. Peptydoglikany
3. Komentarz
3.1. Rodzaj węglowodanu w glikoproteinach
3.2. Proteoglikany
3.3. Mikroheterogenność
3.4. Glikopeptydy i podobne
3.5. *N,O*-Glikoproteiny
3.6. Asjaloglikoproteiny i asjalo-agalaktoglikoproteiny
3.7. Zwięzły system zapisu łańcuchów cukrowych
3.8. System zapisu oligosacharydów *N*-związanych
3.9. Peptydoglikany
4. Piśmiennictwo
5. Dodatek: Umowne konfiguracje i wielkości pierścienia

1. Wstęp

Ogólną nazwą glikokoniugatów objęto różne typy substancji zawierających węglowodany połączone kowalencyjnie z innymi typami związków chemicznych. Głównymi grupami glikokoniugatów są glikoproteiny, glikopeptydy, peptydoglikany, glikolipidy i lipopolisacharydy. W niniejszym dokumencie uwzględniono pierwsze trzy z tych grup. Słownictwo glikolipidów było przedmiotem wcześniejszego dokumentu, który jest obecnie aktualizowany [1].

Wcześnie, bo już w 1907 r, gdy niewiele było wiadomo na temat glikoprotein, zostały one określone przez Komisję Nomenklatury Białek Amerykańskiego Towarzystwa Chemii Biologicznej i Amerykańskiego Towarzystwa Fizjologicznego jako „związki cząsteczek białkowych z substancją lub substancjami zawierającymi grupy węglowodanowe inne niż kwas nukleinowy" [2]. Pomimo ogromnego postępu naszej wiedzy o występowaniu, biosyntezie, właściwościach i funkcjach glikoprotein, definicja ta nadal pozostaje właściwa.

Glikoproteiny są szeroko rozpowszechnione we wszystkich formach życia, z możliwym wyjątkiem eubakterii. Występują w komórkach, zarówno w formie rozpuszczalnej jak i związane z błonami oraz w substancji zewnątrzkomórkowej i w płynach pozakomórkowych. Najbardziej pospolitymi glikoproteinami są te, w których cukier jest związany z białkiem wiązaniami glikozydowymi. Glikozylacja jest jedną z ważnych kotranslacyjnych i potranslacyjnych modyfikacji białek.

Termin „glikoproteina" powinien obejmować proteoglikany, które kiedyś uważano za odrębną klasę związków. Proteoglikany są to takie glikoproteiny, których jednostki węglowodanowe tworzą długie, nierozgałęzione łańcuchy powtarzających się przemiennie reszt heksozaminy i kwasu uronowego lub galaktozy, często siarczanowanych. Proteoglikanów nie zaliczano dawniej do glikoprotein, ponieważ wydawało się, że ich część cukrowa różni się bardzo znacznie od stosunkowo małych, rozgałęzionych, zwykle nieusiarczanowanych jednostek cukrowych, pozbawionych powtarzających się jednostek, występujących w innych glikoproteinach. Inną przyczyną było jedyne w swoim rodzaju rozmieszczenie: proteoglikany występują głównie w tkankach łącznych, gdzie mają swój udział w organizowaniu oraz we właściwościach fizycznych substancji zewnątrzkomórkowej. Wiadomo jednak, że proteoglikany także są glikozylowanymi białkami, syntezowanymi przez działanie glikozylotransferaz,

http://rcin.org.pl

i że powtarzające się dwucukrowe jednostki występują również w typowych glikoproteinach. Proteoglikany są wobec tego uważane za podklasę glikoprotein.

Terminy „glukozylacja (lub glikozylacja) białka" i „glukozylowana (lub glikozylowana) hemoglobina" były używane niewłaściwie w odniesieniu do produktów nieenzymatycznych reakcji między glukozą lub innymi cukrami i wolnymi grupami aminowymi białek. Związki tworzone w ten sposób nie są jednakże glikozydami, ponieważ powstają one w wyniku utworzenia zasady Schiffa z następnym przegrupowaniem Amadori'ego, co daje 1-deoksyketozylowe pochodne białek. Na przykład, produktem reakcji między glukozą i hemoglobiną nie jest glukozylowana hemoglobina, ale *N*-(1-deoksyfruktozylo)hemoglobina. Zaleca się stosowanie terminu „glikacja" na określenie wszystkich reakcji polegających na przyłączeniu cukru do białka lub peptydu, niezależnie od tego czy tworzy się wiązanie glikozydowe czy nie. Produktem glikacji jest glikoproteina lub, w specjalnym przypadku reakcji z hemoglobiną, glikohemoglobina. W odpowiednich przypadkach można użyć dokładniejszej nazwy, takiej jak deoksyfruktozylohemoglobina.

Peptydoglikany, czasami zwane mureinami, są glikokoniugatami znalezionymi tylko w bakteryjnych ściankach komórkowych. Chociaż także składają się z węglowodanów i aminokwasów związanych kowalencyjnie, tworzą odrębną klasę związków, ponieważ: a) nie zawierają części białkowej; b) zawierają cukry nie znalezione gdzie indziej; c) składają się z liniowych polisacharydów (klasy glikozoaminoglikanów) związanych krzyżowo przy pomocy oligopeptydów, tworząc w ten sposób ogromną i sztywną sieć. Dotychczas brak było dostępnej oficjalnej nomenklatury glikoprotein, glikopeptydów i peptydoglikanów. Przygotowując niniejszy dokument stosujemy się do ogólnych zasad słownictwa biochemicznego [3], zwłaszcza tych nowszych, na temat węglowodanów [4-7] oraz aminkowasów i peptydów [8].

2. Słownictwo

2.1. Glikoproteiny, proteoglikany i glikozoaminoglikany

Glikoproteina jest związkiem zawierającym węglowodan (lub glikan) kowalencyjnie związany z białkiem. Węglowodan może być w postaci monosacharydu, disacharydu(ów), oligosacharydu(ów), polisacharydu(ów) lub ich pochodnych (np. sulfo- lub fosfopodstawionych). W cząsteczce glikoproteiny może występować jedna, kilka lub wiele jednostek węglanowych. Proteoglikany są podklasą glikoprotein, w których jednostki węglowodanowe są polisacharydami zawierającymi aminocukry. Takie polisacharydy są także znane jako glikozoaminoglikany.

2.2. Glikopeptydy, glikoaminokwasy i glikozyloaminokwasy

Glikopeptyd jest związkiem zawierającym węglowodan związany z oligopeptydem złożonym z L- i/lub D-aminokwasów. Glikoaminokwas jest sacharydem przyłączonym do pojedynczego aminokwasu za pomocą jakiegokolwiek wiązania kowalencyjnego. Glikozyloaminokwas jest związkiem złożonym z sacharydu przyłączonego poprzez wiązanie glikozylowe (*O*-, *N*- lub *S*-) do aminokwasu. (Wymagane są łączniki, aby nie sugerować, że węglowodan jest koniecznie przyłączony do grupy aminowej).

2.3. Peptydoglikany

Peptydoglikan zawiera glikozoaminoglikan utworzony przez naprzemienne reszty D-glukozoaminy i kwasu muraminowego {2-amino-3-0-[(S)-1-karboksyetylo]-2-deoksy-D-glukozy} albo kwasu L-talozaminuronowego (kwasu 2-amino-2-deoksy-L-taluronowego), które są zwykle *N*-acetylowane lub *N*-glikozylowane. Grupa karboksylowa kwasu muraminowego jest zwykle podstawiona peptydem zawierającym reszty zarówno L- jak i D-aminokwasów, podczas gdy grupy ta w kwasie L-talozaminurowym jest podstawiona przez peptyd zawierający tylko L-aminokwasy.

3. Komentarze

3.1. Rodzaj węglowodanu w glikoproteinach

W wielu glikoproteinach (np. glikoproteinach osocza, takich jak ludzka kwaśna α_1-glikoproteina lub fetuina) węglowodan występuje w postaci oligosacharydów liniowych lub rozgałęzionych, przy czym te ostatnie zawierają aż około 20 reszt monosacharydowych; znane są również glikoproteiny zawierające jednostki mono- lub disacharydowe, np. kolageny, glikoproteiny przeciw zamarzaniu (*antifreeze*) ryb, glikoproteiny podszczękowe (lub podżuchwowe) owcy, jak też takie, które zawierają oligosacharydy złożone z powtarzających się jednostek *N*-acetylogalaktozoaminy (np. pasmo 3 błony ludzkich erytrocytów).

3.2. Proteoglikany

Proteoglikan jest białkiem glikozylowanym przez jeden lub więcej (aż do około 100) glikozoaminoglikanów (Tab. 1).

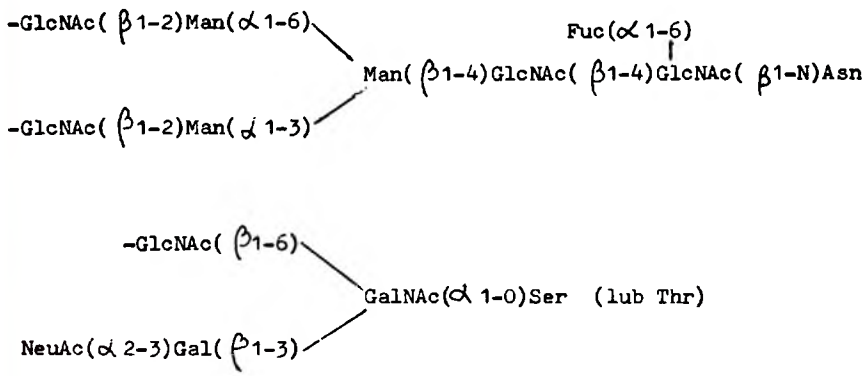
Glikozoaminoglikany proteoglikanów są liniowymi polimerami zawierającymi do około 200 powtarzających się disacharydowych jednostek, które składają się z heksozaminy (D-glukozoaminy lub D-galaktozoaminy) naprzemiennie z kwasem uronowym (D-glukuronowym lub L-iduronowym) lub cukrem obojętnym (D-galaktozą). Heksozoaminy są zwykle *N*-acetylowane, a w niektórych glikozoaminoglikanach D-glukozo-

http://rcin.org.pl

Tabela 1.
Struktura glikozoaminoglikanów. Opracowana głównie na podstawie: Lindahl U, Hook M, (1978) *Ann Rev Biochem* **47**: 385-417 i Rodén L, (1980) w The biochemistry of glycoproteins and proteoglycans, red. W J Lennerz, Plenum Press, New York, 267-371

Nazwa	Powtarzający się disacharyd	Siarczanowanie	Region łączący
Kwas hialuronowy	GlcNAc(β1-4)GlcA(β1-3)	Brak	Nie potwierdzono połączenia z białkiem
Chondroityno 4- i 6-siarczan	GalNAc(β1-4)GlcA(β1-3)	GalNAc-4-*O*-siarczan, 6-*O*-siarczan lub hybrydy	GlcA(β1-3)Gal(β1-3)Gal(β1-4)Xyl-(β1--0)Ser
Siarczan dermatanu	GalNAc(β1-4)GlcA(β1-3) i GalNAc(β1-4)L-IdoA(α1-3)	GalNAc-4-*O*-siarczan; lub 6-*O*-siarczan; kwas L-iduronowy może być siarczanowany w pozycji 2	GlcA(β1-3)Gal(β1-3)Gal(β1-4)Xyl-(β1--0)Ser
Heparyna i siarczan heparanu	GlcNR(α1-4)GlcA(β1-4) i GlcNR(α1-4)L-IdoA(α1-4)	W heparynie (bogato siarczanowanej) R to głównie SO_3H i trochę acetylu, w siarczanie heparanu ogólnie mniej SO_3H i więcej acetylu niż w heparynie. Trochę N-acetylo-D-glukozoaminy jest 6-*O*-siarczanowanej i trochę kwasu L-iduronowego jest 2-*O*-siarczanowanego	GlcA(β1-3)Gal(β1-3)Gal(β1-4)Xyl-(β1--0)Ser
Siarczan keratanu	GlcNAc(β1-3)Gal(β1-4)	GlcNAc-6-*O*-siarczan; Gal-6-*O*-siarczan	Patrz Rys. 1

amina jest *N*-siarczanowana. Różne stopnie usiarczanowania wynikają z występowania grup siarczanowych w innych pozycjach heksozamin jak też w kwasie L-iduronowym. Łańcuch powtarzających się jednostek jest przyłączony do białka przez oligosacharyd o strukturze odmiennej od powtarzających się jednostek. Ten region łączący (patrz Tab. 1) jest identyczny w większości proteoglikanów (siarczany chondroityny, siarczan dermatanu, heparyna, siarczan herparanu), ale jest odmienny w siarczanie keratanu. Ten ostatni glikozoaminoglikan zawiera powtarzające się jednostki *N*-acetylolaktozaminy, które są *O*-siarczanowane (Ryc. 1).



Ryc. 1. Region łączący siarczan keratanu rogówkowego i szkieletowego. Struktura górna przedstawia region łączący w siarczanie keratanu typu I (rogówkowego); dolna przedstawia go w siarczanie keratanu typu II (szkieletowego).

Glikozoaminy proteoglikanów są anionowymi polielektrolitami, ponieważ zawierają kwasy uronowe i ugrupowania siarczanowe, to też zwno je „kwaśne glikozoaminoglikany" (równoznaczne ze starym terminem „kwaśne mukopolisacharydy"). Proteoglikany mogą też zawierać jeden lub więcej oligosacharydów o strukturach podobnych do tych, które znaleziono w innych glikoproteinach.

Wyróżniono kilka chorób wywołanych zaburzeniami metabolizmu proteoglikanów, łącznie z zespołami Huntera i Hurlera. Określa się je jako mukopolisacharydozy, ale właściwszą nazwą byłaby „glikoproteinozy", gdyż obejmuje ona również inne zaburzenia metabolizmu glikoprotein, takie jak mannozydoza i fukozydoza.

3.3. Mikroheterogenność

Poszczególne glikoproteiny mogą występować w odmianach, które różnią się co do struktury jednej lub więcej jednostek węglowodanowych, a zjawisko to jest znane jako mikroheterogenność. Takie różnice mogą wpływać zarówno na wielkość jak i na ładunek indywidualnych glikoprotein; czasami różnice mogą być związane wyłącznie ze zmienionymi pozycjami połączeń w jednostkach węglowodanowych. Na przykład owoalbumina kurza zawiera pojedynczą glikozylowaną resztę aminokwasową (*Asn*-293), jednakże w tym miejscu zidentyfikowano ponad tuzin różnych oligosacharydów. W proteoglikanach indywidualne łańcuchy glikozoaminoglikanowe mogą różnić się co

http://rcin.org.pl

do struktury, np. stopniem usiarczanowania, proporcją kwasu glukuronowego do kwasu L-iduronowego i długością łańcucha. Proteoglikany są wobec tego wysoce polidyspersyjne, w przeciwieństwie do typowych glikoprotein, które pomimo swej mikroheterogenności są nieznacznie polidyspersyjne co do wielkości swych cząsteczek.

3.4. Glikopeptydy i inne

Glikopeptydy, glikoaminokwasy, glikozyloaminokwasy i glikozylopeptydy otrzymuje się drogą enzymatycznej lub chemicznej degradacji glikoprotein albo za pomocą syntezy chemicznej lub enzymatycznej. Przykładami glikozyloaminokwasów, które stanowią pospolite jednostki łączące pomiędzy węglowodanem a białkiem w glikoproteinach są (patrz Tab. 2): 2-acetamido-*N*-(L-aspar-4-ylo)-2-deoksy-β-D-glukopiranozyloamina, to znaczy N^4-(*N*-acetylo-β-D-glukozoaminylo) asparagina, która jest zapisywana skrótowo jako (GlcNAc-)Asn (nawiasy, obejmujące tutaj węglowodany umieszczone przy symbolu reszty aminokwasowej wskazują podstawienie w jej łańcuchu bocznym: patrz dział 3AA-17.2 w poz. 8); O^3-(*N*-acetylo-α-D-galaktozoaminylo)-seryna i treonina, (GalNAc-)-Ser i (GalNAc-)Thr:, *O*-β-D-ksylozyloseryna, (Xyl-)Ser:, O^5-α-D-galaktozylohydroksylizyna[1], (Gal-)Hyl; oraz β-L-arabinozylohydroksyprolina[2], (L-Ara-)Hyp. Innym przykładem glikoaminokwasu jest [Man_9-GlcNAc (β1→4)-GlcNAc-] *Asn*, wydzielony z mieszaniny po proteolizie aglutyniny ziaren soi. Taki składnik można uważać za oligosacharyloasparaginę.

3.5. *N*-,*O*-Glikoproteiny

W razie potrzeby sposób połączenia między węglowodanem a białkiem można określić przy pomocy lokantów *N*- lub *O*-. Lokant *N*- jest używany do zapisu wiązania *N*-glikozylowego z asparaginą. *N*-związane oligosacharydy są podzielone na dwie główne klasy: typ *N*-acetylolaktozoaminowy, zawierający *N*-acetylo-D-glukozoaminę, D-mannozę, D-galaktozę, L-fukozę i kwas sjalowy; oraz typ oligomannozowy, zawierający *N*-acetylo-D-glukozoaminę i zmienną liczbę reszt D-mannozy. Struktury zawierające oligosacharydy, zarówno typu oligomannozowego jak i *N*-acetylolaktozoaminowego określa się jako typ hybrydowy. Przykładami *N*-glikoprotein (lub *N*-glikozyloprotein) są owoalbumina kurza, rybonukleaza wieprzowa, ludzka kwaśna α_1-glikoproteina i aglutynina ziaren soi.

Lokant *O*- jest używany do zapisu wiązania *O*-glikozylowego z seryną, treoniną, hydroksylizyną lub hydroksyproliną. Glikoproteina podszczękowa owcy, kolagen, glikoproteiny przeciw zamarzaniu ryb oraz lektyna ziemniaka są *O*-glikoproteinami (lub *O*-glikozyloproteinami).

Dwa typy wiązania węglowodan-peptyd w tym samym białku lub łańcuchu peptydowym można zapisać za pomocą kombinacji lokantów. Stąd fetuityna cielęca, prokolagen, glikoforyna błony ludzkich erytrocytów i gonadotropina kosmówki ludzkiej są *N*-,*O*-glikoproteinami (lub *N*-,*O*-glikozyloproteinami).

3.6. Asjaloglikoproteiny i asjalo-agalaktoglikoproteiny

Glikoproteiny, z których został usunięty kwas sjalowy (przez potraktowanie enzymem lub łagodnym kwasem) określa za pomocą przedrostka asjalo-, np. asjalo-α_1-kwaśna glikoproteina i asjalofetuityna. Usunięcie zarówno kwasu sjalowego jak i galaktozy daje asjalo-agalaktoglikoproteiny.

3.7. Zwięzły zapis łańcuchów cukrowych

W celu zapisania struktury łańcuchów cukrowych, koniec nieredukujący łańcucha węglowodanowego należy zawsze umieszczać po lewej stronie (patrz odn. 6). W bieżącej praktyce można stosować albo formę rozszerzoną (a) albo formę zwięzłą (b), które pozwalają na przedstawienie struktury w jednej, jak też w dwu i więcej liniach, w których najdłuższy łańcuch powinien być zawsze łańcuchem głównym:

a) Forma rozszerzona

β-D-Gal*p*(1 → 4)-β-D-GlcNAc*p*-(1 → 2)-α-D-Man*p*-(1 → 6)-

3
↑
1
α-L-Fuc*p*

b) Forma zwięzła w dwu liniach

Gal(β1-4)GlcNAc(β1-2)Man(α1-6)
|
Fuc(α1-3)

lub forma zwięzła w jednej linii

Gal(β1-4)[Fuc(α1-3)]GlcNAc(β1-2)Man(α1-6)

Forma zwięzła jest jednak w dalszym ciągu niepotrzebnie długa i dlatego nie byłoby większej szkody, jeśli tę formę skróciłoby się jeszcze bardziej przez (i) pominięcie lokantów anomerycznych atomów węgla, (ii) pominięcie nawiasów wyszczególniających wiązanie oraz (iii) pominięcie, jeśli to pożądane, łączników. Proponujemy wobec tego bardziej zwięzłą albo krótką formę zapisu (c):

[1] Ten składnik mógłby być dokładniej opisany jako 5(α-D-galaktopiranozyloksy)-L-lizyna, ale „hydroksylizyna" jest uważana za nazwę zwyczajową [8], tak więc na niej oparte są nazwy.
[2] Hydroksyprolina jest nazwą zwyczajową trans-4-hydroksy-L-proliny.

http://rcin.org.pl

c) Forma krótka

Galβ4(Fucα3)GlcNAcβ2Manα6-

Podobnie sekwencja glikopeptydu, przedstawiona w formie zwięzłej w dwu liniach jako

Gal(β1-3)GalNAc(α1-0)
|
Ala-Thr-Ala

albo w zwięzłej formie w jednej linii jako

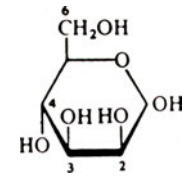
-Ala-[Gal(β1-3)GalNAc(α1-0)]Thr-Ala-

może być zapisana w formie krótkiej w dwu liniach jako

Galβ3GalNAcα—┐
-Ala-Thr-Ala-

albo w krótkiej formie w jednej linii jako

-Ala-(Galβ3GaNAcα)Thr-Ala-



Ryc. 2. Wzór Hawortha struktury piranozowej monosacharydów.

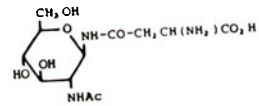
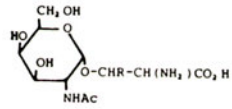
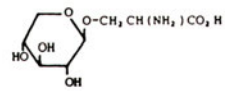
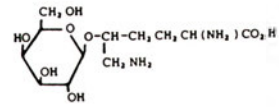
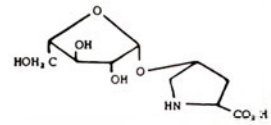
3.9. Peptydoglikany

W peptydoglikanach, jednostki peptydowe sąsiadujących polisacharydów (glikozoaminoglikanów) mogą być usieciowane za pomocą wiązania peptydowego pomiędzy C-końcową resztą alaniny jednej podjednostki peptydowej a grupą ω-aminową reszty diaminokwasu drugiej podjednostki (np. L-lizyny lub kwasu mezo-diaminopimelinowego) urastając w ten sposób w gigantyczną makrocząsteczkę, która tworzy sztywną ścianę komórkową („*sacculus*"). Makrocząsteczka ta wyróżnia się tym, że występuje jako jednocząsteczkowa warstwa pomiędzy błoną wewnętrzną a zewnętrzną u bakterii Gram-ujemnych oraz jako wielocząsteczkowa warstwa, często zasocjowana kowalencyjnie lub niekowelancyjnie z różnymi dodatkowymi składnikami (kwasy tejchojowe, obojętne polisacharydy itd.) u bakterii Gram-dodatnich.

Szerokie badania peptydoglikanów tysięcy szczepów bakteryjnych wykazały istnienie ponad 100 chemotypów u eubakterii [9]. Peptydoglikany eubakterii po-

Tab. 2

Pospolicie występujące glikozyloaminokwasy. W oparciu o Sharon N, Lis H, (1982) w: The Proteins, wyd. 3. red. H Neurath, R L Hill, t. 5. Academic Press, New York, 1-144.

Przykład	Struktura	Występowanie
N-glikozyd[a] β-N-Acetyloglukozaminylo- -asparagina, (GlcNAc-)Asn		Szeroko rozpowszechnione u zwierząt, roślin i mikroorganizmów
O-glikozydy α-N-Acetylogalaktozaminylo- seryna lub -treonina, (GalNAc-)Ser, (GalNAc-)Thr		Glikoproteiny pochodzenia zwierzęcego
β-Ksylozyloseryna, (Xyl-)Ser		Proteoglikany, tyreoglobulina ludzka
β-Galaktozylo-hydroksylizyna (Gal-)Hyl		Kolagen
β-L-Arabinozylo-hydroksyprolina (L-Ara-)Hyp		Glikoproteiny roślin i glonów

[a] Tradycyjnie termin "glikozyd" odnosił się do związków O-związanych; tutaj użyliśmy terminu "N-glikozyd" zamiast "azotowy analog glikozydu", który jest nieporęczny

3.8. Zapis *N*-związanych oligosacharydów

Oligosacharydy *N*-związane zawierają z reguły następujący rdzeń pentasacharydowy:

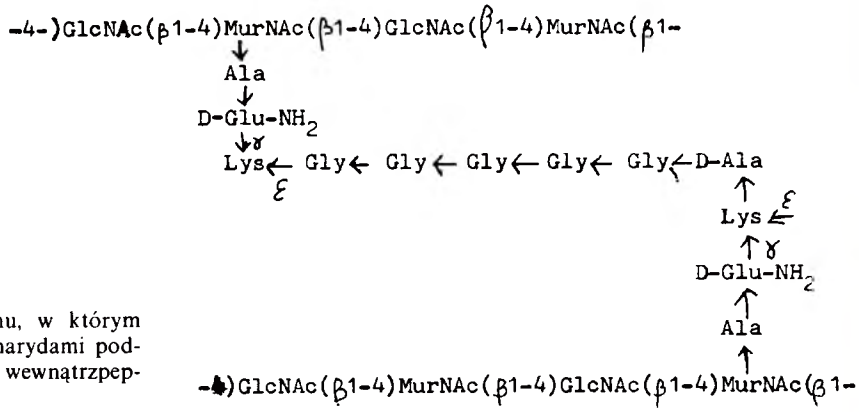
Manα6
Manβ4GlcNAcβ4GlcNAc
Manα3

W celu ujednolicenia, umiejscowienie podstawienia powinno być pisane jak powyżej w zgodności z wzorem Hawortha struktury piranozowej monosacharydów, analogicznie z cząsteczką glikogenu (Ryc. 2)

http://rcin.org.pl

dzielono na dwie główne grupy (A i B) i kilka podgrup według sposobu usieciowania. W obrębie grupy A wyróżniono dwie główne podgrupy: pierwszą, w której C-końcowa reszta alaniny jest bezpośrednio przyłączona do ω-aminowej grupy diaminokwasu w pozycji 3 podjednostki peptydowej sąsiadującego polisacharydu (glikozoaminoglikanu) oraz drugą, w której usieciowaniu pośredniczy wewnątrzpeptydowy mostek złożony z jednej lub aż do 5 reszt aminokwasowych (np. typ $[Lys\text{-}Gly]_5$, patrz (Ryc. 3). W zależności od rodzaju diaminokwasu w pozycji 3 i aminokwasów służących jako mostki wewnątrzpeptydowe istnieje wiele odmian tych podgrup mureiny. W obrębie typów peptydoglikanowych grupy B wiązanie sieciujące nie występuje w pozycji 3 podjednostki peptydowej, ale w pozycji 2, z wykorzystaniem grupy α-karboksylowej reszty D-glutaminianowej. Wewnątrzpeptydowy mostek musi zawierać diaminokwas, którym może być lizyna, ornityna lub kwas diaminomasłowy w konfiguracji L do D. Drugą szczególną charakterystyczną cechą typów peptydoglikanowych grupy B jest zastąpienie reszty L-alaniny w pozycji 1 podjednostki peptydowej przez glicynę lub serynę.

U archebakterii niektóre organizmy zawierają peptydoglikan, który różni się pod pewnymi względami od opisanych powyżej, typowych dla eubakterii (10, 11). Zawiera on polisacharyd utworzony przez naprzemienne *N*-acetylowane, połączone (β1-3) reszty D-glukozoaminy lub D-galaktozoaminy i *N*-acetylowane, połączone (β1-3) reszty kwasu L-talozaminuronowego oraz peptyd zawierający wyłącznie L-aminokwasy przyłączone do grupy karboksylowej kwasu L-talozaminuronowego. Jednostki peptydowe sąsiadujących polisacharydów mogą być usieciowane za pomocą wiązania peptydowego pomiędzy grupą γ-karboksylową kwasu glutaminowego jednej podjednostki peptydowej oraz grupę α-aminową reszty lizyny drugiej podjednostki, tworząc w ten sposób sztywną ścianę komórkową bakterii metanogennych. Ta wielocząsteczkowa warstwa jest często zasocjowana kowalencyjnie, ale także niekowalencyjnie z obojętnymi polisacharydami. Dotychczas opisano tylko kilka chemotypów takich peptydoglikanów.



Ryc. 3. Struktura pierwszorzędowa peptydoglikanu, w którym w usieciowaniu między sąsiednimi polisacharydami podstawionymi peptydami pośredniczy mostek wewnątrzpeptydowy zawierający $Lys\text{-}[Gly]_5$.

Piśmiennictwo

1. IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature (CBN), The nomenclature of lipids, Recommendations 1974, *Biochem J* (1978) **171**: 21-35 i inne czasopisma. Patrz także str. 122-132 w (3) oraz *Nowe Polskie Słownictwo Biochemiczne*, Red. A. Morawiecki, PWN, Warszawa 1983, 195-203.
2. Joint Recommendations of the Physiological and Biochemical Committees on Protein Nomenclature, R H Chittenden, O Folin, W J Gies, W Koch, T B Osborne, P A Levene, J A Mandel, A P Mathews, L B Mendel, (1908), *J Biol Chem* **4**: XLVIII-LI.
3. International Union of Biochemistry (1978). Biochemical Nomenclature and related documents. The Biochemical Society, London.
4. IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBN). Conformational nomenclature for five and six-membered rings forms of monosaccharides and their derivatives. Recommendations 1980. *Eur J Biochem* (1980) **111**: 295-298; *Post Biochem* (1985) **31**: 684-690.
5. IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBN). Nomenclature of unsaturated monosaccharides. Recommendations 1980. *Eur J Biochem* (1981) **119**: 1-3; *Post Biochem* (1985) **31**: 656-661.
6. IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBN). Abbreviated terminology of oligosaccharide chains. Recommendations 1980. *Eur J Biochem* (1982) **126**: 433-437; *Post Biochem* (1985), **31**: 662-672.
7. IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBN). Symbols for specifying the conformation of polysaccharide chains. Recommendations 1981. *Eur J Biochem* (1983) **131**: 5-7; *Post Biochem* (1985) **31**: 677-684.
8. IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBN).Nomenclature and symbolism for amino acids and peptides. Recommendations 1983. *Eur J Biochem* (1984) **138**: 9-37.
9. Schleifer K H, Kandler O, (1972) *Bacteriol Rev* **36**: 407-477.
10. Kandler O, (1982) *Zbl Bakt Hyg I Abt Orig* **C3**: 149-160.
11. König H, Kralik R, Kandler O, (1982) *Zbl Bakt Hyg I Abt Orig* **C3**: 179-191.

5. Dodatek: Umowne konfiguracje i wielkości pierścienia

W zwięzłym systemie symboli reszt cukrowych sugestia o pospolicie występującej konfiguracji i wielkości pierścienia (zwykle piranoza) zawarta jest już

http://rcin.org.pl

w samym symbolu. Tak więc Gal oznacza D-galaktopiranozę; Man, D-mannopiranozę; Fuc, L-fukopiranozę; GlcNAc, 2-acetamido-2-deoksy-D-glukopiranozę lub *N*-acetylo-D-glukozoaminę; Neu5Ac (który może być skrócony do NeuAc), kwas *N*-acetyloneuraminowy. Symbol Sia oznnacza kwas sjalowy, ogólny termin, który może być również użyty w przypadku, gdy nie jest znana dokładna struktura. Jeżeli wiadomo, że konfiguracja lub wielkość pierścienia różni się od powszechnie występujących, należy to wskazać przez użycie odpowiednich symboli z rozszerzonego systemu. O ile nie wskazano inaczej, konfiguracja aminokwasów jest L. Chociaż takie symbole jak Gal i Man są użyteczne przy przedstawianiu struktur oligosacharydów, nie należy jednak ich używać w tekscie dla zapisu monosacharydów.

Wskazówki dla autorów

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

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

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

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

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

Redakcja prosi Autorów o przestrzeganie następujących wskazówek szczegółowych:

TEKST: Maszynopis powinien być napisany jednostronnie czcionką wielkości standartowej, z podwójną interlinią, z lewym marginesem ok. 4 cm.
W tekście nie należy stosować żadnych podkreśleń, ani rozstrzelonego druku. Ewentualne sugestie co do charakteru czcionki drukarskiej mogą Autorzy zaznaczyć ołówkiem na marginesach maszynopisu. W przypadku stosowania w tekście liter alfabetu greckiego trzeba na marginesie wpisać ołówkiem ich fonetyczne brzmienie.

Strona informacyjna maszynopisu jest nienumerowana, zawiera imiona i nazwisko (a) autora (ów), nazwy, adresy wraz z numerem telefonu zakładów (w języku polskim i angielskim), w których pracują autorzy, adres do korespondencji nr telefonu i ewentualnie fax, adresy prywatne autorów, tytuł artykułu w języku polskim i angielskim oraz — w prawym dolnym rogu — liczbę tabel, rycin, wzorów i fotografii oraz skrót tytułu pracy (do 25 znaków).

Strona 1 (tytułowa) zawiera imiona i nazwiska autorów, tytuł pracy w języku polskim i angielskim, rzeczowy spis treści też w obu językach, tytuł naukowy każdego z autorów i ich miejsce pracy z adresem pocztowym oraz wykaz stosowanych skrótów.
Kolejno numerowane dalsze strony obejmują tekst pracy, piśmiennictwo, tabele, podpisy i objaśnienia rycin, wzorów i fotografii.

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

1. Hildenbrandt GR, Aronson NN (1980) Biochim Biophys Acta **631**: 499—502
2. Bostock CJ, Sumner AT (1978) The Eukaryotic Chromosome, Elsevier, North-Holand, Amsterdam
3. Norberth T, Piscator M (1979) W: Friberg L, Nordberg GF, Von VB (red) Handbook on the Toxicology of Metals. Elsevier, North-Holland, Amsterdam, str 541-553
4. Delej J, Kesters K (1975) W: Florkin M, Stotz EH (red) Comprehensive Biochemistry t 29B. Elsevier, North-Holland Amsterdam, str 1-77

http://rcin.org.pl

5. Franks NP, Lieb WR (1981) W: Knight CG (red) Research Monographs in Cell and Tissue Physiology, t 7. Elsevier, North-Holland, Amsterdam, str 243-272

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

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

Redakcja kwartalnika „Postępy Biochemii"
Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego,
ul. Pasteura 3,
02-093 Warszawa

Drukarnia Naukowo-Techniczna, W-wa, zam. 3378/12/92

http://rcin.org.pl

Nowe wydawnictwa PTBioch!

I. Repetytorium z biochemii w testach pt.

„ZARYS BIOCHEMII W PYTANIACH I ODPOWIEDZIACH"

praca zbiorowa pod red. Lilli Lachowicz
Warszawa 1992 cena 30 000 zł

II. Seria krótkich monografii biochemicznych szczególnie przydatnych w pracy dydaktycznej:

„ROZPAD FOSFOLIPIDÓW A PRZEKAZYWANIE INFORMACJI W KOMÓRCE"

autor — Jolanta Barańska
Warszawa 1992 cena 30 000 zł

Wykład akademicki pod powyższym tytułem uzyskał nagrodę Polskiego Towarzystwa Biochemicznego w 1992 roku

„ATPazy — BUDOWA I FUNKCJE"

autorzy: Wiesława Leśniak
i Zofia Porembska
Warszawa 1992 cena 30 000 zł

Zamówienia prosimy kierować na adres Zarząd Główny Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, ul. Freta 16, 00-227 Warszawa, tel. 31 13 04

http://rcin.org.pl

2nd IUBMB CONFERENCE
BIOCHEMISTRY OF CELL MEMBRANES
SEPTEMBER 29 — October 3, 1993
Bari, Italy

The 2nd IUBMB International Conference — "Biochemistry of Cell Membranes" — will be held at the Sheraton Congress Centre in Bari, Italy on September 29 — October 3, 1993.
The Conference, which will cover the most topical aspects and developments in the area of biochemistry of cell membranes, is intended for biochemists and scientists of related disciplines.

The Secretariat
2nd IUBMB Conference c/o Centro Internazionale Congressi Viale Papa Pio XII, 18 — 70125 Bari, Italy
Tel. +39-80-517299, Fax +39-80-514533

http://rcin.org.pl