POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE

postępy biochemii

PL ISSN
0032-5422

Advances in Biochemistry

TOM 36, NR 1-2, 1990

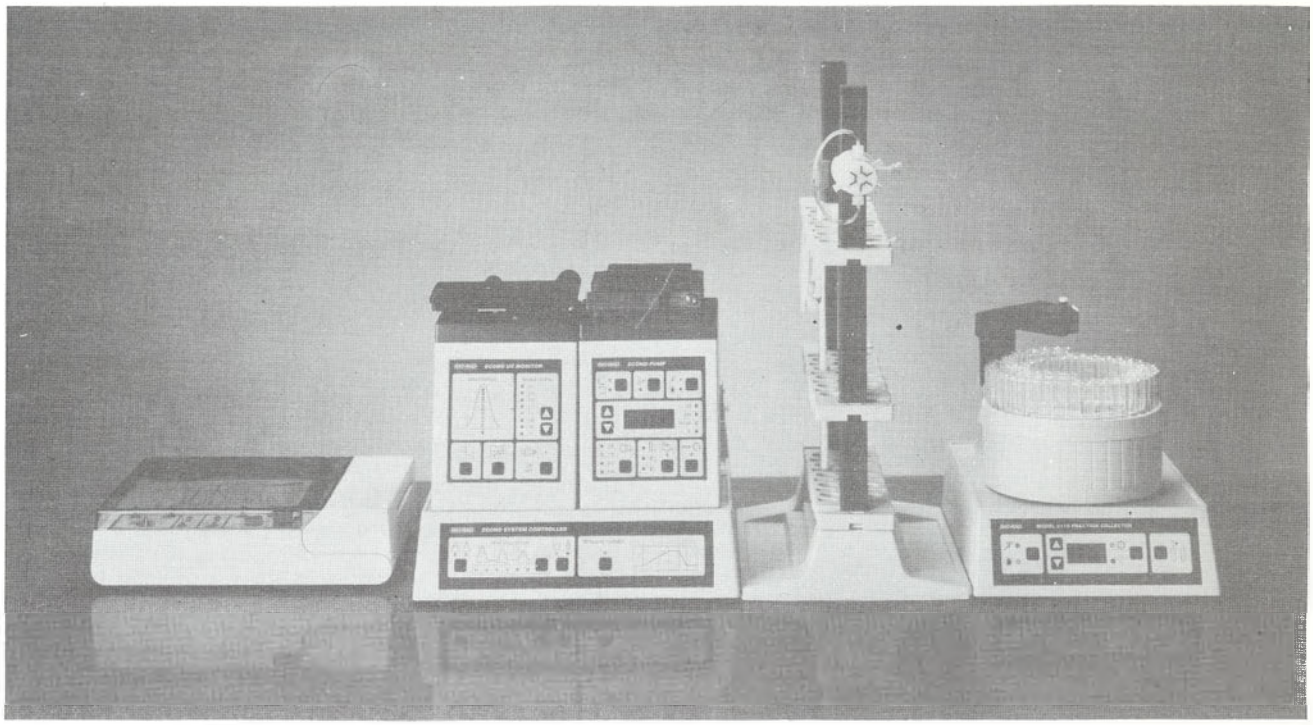
Redagowanie RNA 2
Ekspresja rDNA 4
Enzymatyczna amplifikacja DNA 14
Sekwencjonowanie DNA 21
Białka szoku termicznego 32
Recenzje książek 44

Konkurs P. T. Bioch. 19
Stypendia EMBO 31
Prenumerata 47

http://rcin.org.pl

ECONO ™ SYSTEM

Chromatography redesigned by *BIO-RAD* the leading company in bioseparations



The new modular Low Pressure Chromatography System will make your life much easier. Purchase the individual components or the complete ready-to-use system. The Gradient Econo Chromatography System consists of

* **Pump**
* **Programmable Gradient Controller**
* **Column Rack**
* **UV Monitor 254/280 nm UV Detection**
* **Fraction Collector**
* **Strip Chart Recorder**
* **Injector Valve**

The Econo Low Pressure Chromatography system is cold-room compatible and has a protein friendly format. Now You don't have to design your protein chromatography system yourself anymore. Just order the complete Econo System.

Ordering address right from the stock:

BIO-RAD Laboratories Ges.m.b.H.
Auhofstraße 78 D
A-1130 WIEN
Tel. 222/82 89 010
Fax 222/82 85 629
Telex 136565 biora a

(1 year full warranty)

Introductory Price

US-$ 9990.00

http://rcin.org.pl

POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE
postępy biochemii
Advances in Biochemistry

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

REDAKCJA
Editorial Board

REDAKTOR NACZELNY
Editor in chief
ZOFIA ZIELIŃSKA
(Tel. 31-24-03)

REDAKTOR ZESZYTU
Editor of this issue
GRAŻYNA PALAMARCZYK

REDAKTORZY
Editors
JACEK KUŹNICKI
(Tel. 659-85-71)
Fax: (22) 22-53-42,
BOŻENA SZYMANOWSKA

RECENZENCI
Referees

MAGDALENA FIKUS
(Warszawa)
MAŁGORZATA PIOTROWSKA
(Warszawa)
ANDRZEJ PŁUCIENNICZAK
(Łódź)
JAN WIŚNIEWSKI
(Gliwice)

ADRES REDAKCJI
Address
REDAKCJA
„POSTĘPÓW BIOCHEMII"
INSTYTUT BIOLOGII DOŚWIADCZALNEJ
im. M. Nenckiego PAN
ul. Pasteura 3,
02-093 Warszawa
Tel. (2) 659-85-71 w. 209
Fax (22) 22-53-42
Telex 81-48-92

Od redakcji

Zbliża się koniec grudnia 1990 roku, dotąd jednak nie ukazał się 4 zeszyt, 35 tomu, sygnowany rokiem 1989. Tak znaczne przedłużenie cyklu wydawniczego skłania Redakcję do zrezygnowania z dalszej współpracy z Państwowym Wydawnictwem Naukowym, a Zarząd Główny do zbierania ofert innych firm wydawniczych. Zanim jednak zostanie wybrana najkorzystniejsza z nich materiały przeznaczone do publikacji w tomie 36, rocznika 1990 tytułem próby przekazujemy do druku w SUPER-GRAF.

Zmierzając do nadania kwartalnikowi bardziej nowoczesnej postaci wybraliśmy format A4, zmieniliśmy okładkę, układ tekstu. Rozważamy celowość publikowania, w języku angielskim — wyłącznie na zaproszenie Redakcji — prac typu minireviews, których przedmiotem byłyby wnioski i hipotezy oparte na wynikach własnych badań wykonanych w kraju.

Zmienia się też sposób finansowania naszego pisma. Od rocznika 1991 przechodzimy na własny rozrachunek. Informujemy, że podstawę materialną kwartalnika stanowić będą wpływy z prenumerat i ogłoszeń. W związku z ogólnym wzrostem cen wzrosną oczywiście ceny naszych zeszytów. Przewidujemy znaczną podwyżkę prenumerat dokonywanych przez instytucje, mniejszą — prenumerat indywidualnych. Zgłoszenia prenumerat i ewentualne pytania prosimy kierować na adres Zarządu Głównego Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, ul. Freta 16, 00-227 Warszawa. Warunki prenumerat oraz nr konta Towarzystwa podajemy na stronie 47 i 48.

SPIS TREŚCI

Redagowanie RNA — nowo odkryty mechanizm zmian informacji genetycznej
RNA editing — newly described mechanism of genetic information changes
MACIEJ SZYMAŃSKI, JAN BARCISZEWSKI 2

Ekspresja eukariotycznych genów rDNA
rDNA gene expression in *Eukaryotes*
WOJCIECH SWAT, GRZEGORZ BUŁAJ, JAN SZOPA . 4

Enzymatyczna amplifikacja *in vitro* specyficznych sekwencji DNA
In vitro enzymatic amplification of specific DNA sequences
MAŁGORZATA JUNGERMAN, RYSZARD SŁOMSKI .. 14

Nowoczesne metody sekwencjonowania DNA
Modern methods of DNA sequencing
JAN WRZESIŃSKI, WŁODZIMIERZ KRZYŻOSIAK 21

Rola białek szoku termicznego
Role of the heat shock proteins
BARBARA LIPIŃSKA..... 32

Recenzje książek 44
Konkurs Polskiego Towarzystwa Biochemicznego 19
Stypendia EMBO 31
Kursy FEBS 46
Warunki prenumeraty 47

http://rcin.org.pl

Redagowanie RNA — nowo odkryty mechanizm zmian informacji genetycznej

RNA editing — newly described mechanism of genetic information changes — minireview

MACIEJ SZYMAŃSKI [1]
JAN BARCISZEWSKI [2]

Do połowy lat siedemdziesiątych dominowało przekonanie o kolinearności sekwencji nukleotydowej genów (DNA) oraz produktów ich transkrypcji tj. informacyjnych RNA (mRNA), rybosomalnych RNA (rRNA) oraz transferowych RNA (tRNA). W roku 1977 po raz pierwszy wykazano eksperymentalnie, że DNA adenowirusa zawiera odcinki sekwencji, których odpowiedniki nie występują w dojrzałych mRNA [1]. Proces usuwania z RNA odcinków niekodujących (ang. *intron*) oraz łączenie fragmentów kodujących (ang. *exon*) określa się terminem składanie (ang. *splicing*).

Innym sposobem zmiany struktury pierwszorzędnej pierwotnego transkryptu jest redagowanie (edytowanie) RNA (ang. *RNA editing*). W szerokim znaczeniu tego słowa przemiana ta obejmować może modyfikacje inne niż wycinanie intronów pierwotnego transkryptu poprzez:

1. przyłączanie trójnukleotydu CCA do końca 3'transkryptów niektórych tRNA,
2. przyłączanie modyfikowanego nukleotydu 2,2,7--trójmetyloguanozyny do końca 5' niektórych niskocząsteczkowych RNA i mRNA, lub 7-metyloguanozyny do końca 5'większości eukariotycznych mRNA,
3. modyfikacja nukleotydów w tRNA, snRNA (small nuclear RNA) rRNA, mRNA,
4. tworzenie specyficznego aminoacylo-tRNA z błędnie acylowanych tRNA,
5. specyficzną zmianę C→U w niektórych transkryptach mitochondrialnych u roślin,
6. dodawanie i usuwanie reszt urydynowych lub cytydynowych w określonych miejscach pierwotnego transkryptu (*Kinetoplastida, Physarum polycephalum*).

Obecnie termin redagowanie RNA używany jest w węższym znaczeniu tylko dla określenia dwóch ostatnich typów modyfikacji, obejmujących pierwotne transkrypty genów kodujących białka. Wynikiem tych modyfikacji są zmiany w pierwotnej ramce odczytu, prowadzące do zmiany jej znaczenia. Po raz pierwszy zjawisko to zostało opisane w roku 1986 dla mRNA podjednostki II oksydazy cytochromowej w mitochondriach *Trypanosoma brucei* i *Crithidia fasciculata* [2]. Gen tego białka zawiera wewnętrzne przesunięcie fazy odczytu (ang. *frameshift*), wynoszące -1, które ulega supresji poprzez wstawienie czterech dodatkowych reszt urydyny w regionie 5' sekwencji kodującej pierwotnego transkryptu. W podobny sposób modyfikacji ulega wiele innych genów mitochondrialnych u *Kinetoplastida*. Zakres modyfikacji i region, w których one zachodzą są zależne od RNA. Geny, których transkrypty podlegają redagowaniu określa się jako kryptogeny. Na podstawie dotychczasowych badań wyróżniono trzy typy kryptogenów [3]:

1. redagowane w środku sekwencji kodującej,
2. redagowane w rejonie 5' sekwencji kodującej,
3. redagowane na całej długości mRNA.

Najbardziej spektakularnym przykładem redagowania RNA jest modyfikacja transkryptu genu podjednostki III oksydazy cytochromowej (COIII) u *T. brucei* [4]. Początkowo w genomie mitochondrialnym tego pierwotniaka nie stwierdzono występowania wspomnianego genu. Nie znaleziono genu tego również w genomie jądrowym. Na podstawie względnego położenia w genomie mitochondrialnym, zidentyfikowano odcinek, bogaty w pary GC, którego pozycja odpowiada pozycjom genów COIII u *C. fasciculata* i *L. tarentolae*. Sekwencja ta może być komplementarna do sekwencji mRNA, jeśli zostaną wprowadzone do niej dodatkowe reszty urydynowe, oraz nastąpi usunięcie kilkunastu innych reszt urydyny kodowanych przez gen. Jest to pierwszy znany przypadek, w którym edycja obejmuje usuwanie nukleotydów kodowanych przez gen. Do badanego odcinka

[1] Student V roku, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu, [2] Doc. dr hab. w Instytucie Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk, ul. Noskowskiego 12/14, 61-704 Poznań.

http://rcin.org.pl

mRNA, odpowiadającego 65% długości dojrzałej cząsteczki wstawieniu ulega ponad 50% nukleotydów.

Redagowanie RNA stwierdzono również w przypadku grzybów, roślin i kręgowców. W mitochondrialnym genie podjednostki α syntetazy ATP *Physarum polycephalum* odnotowano ponad 50 przesunięć fazy odczytu [-1], które ulegają supresji przez wstawienie pojedynczych reszt cytydyny [3], między którymi zachowane są stałe ilości nukleotydów. W przeciwieństwie do *Kinetoplastida* włączaniu ulegają reszty cytydyny, a nie urydyny.

Odmienny typ redagowania mRNA zachodzi u ssaków i roślin. U człowieka organospecyficzna zamiana C na U w mRNA kodującym apolipoproteinę powoduje syntezę typowej dla tkanki jelita apolipoproteiny B-48 (apo B-48) [6, 12]. Białko to jest produktem tego samego genu, który koduje wątrobową apolipoproteinę B-100 (apo B-100). Powstaje ono w wyniku translacji zmodyfikowanego mRNA, w którym kodon glutaminy CAA (Gln ^{2153}) zmieniony został na kodon stop — UAA (ochre). Obydwa białka mają podobne funkcje, przy czym apo B-48 bez C-końcowego odcinka nie ma zdolności wiązania receptora LDL. Mechanizm zmiany C na U nie jest dotychczas znany. Nie wiadomo, czy ta konwersja zachodzi na poziomie pierwotnego transkryptu, czy na poziomie dojrzałej cząsteczki mRNA.

Podobny mechanizm redagowania zauważono w mitochondriach roślinnych, w których, jak dotychczas sądzono, realizowany jest unikalny kod genetyczny [7]. Jedną z jego cech jest kodowanie tryptofanu przez kodon argininy CGG. Ostatnio wykazano, że ta pozorna niezgodność jest wynikiem redagowania mRNA, np. *cox3, nad3, rps12* w mitochondriach pszenicy [8], w których kodony CGG występujące w pozycjach odpowiadających tryptofanowi w łańcuchu polipeptydowym ulegają zmianie w kodony UGG, kodujące tryptofan. Redagowaniu prawdopodobnie mogą również podlegać inne kodony [9]. Na tej podstawie można powiedzieć, że redagowanie RNA stanowi także mechanizm korekcyjny pozwalający na włączanie odpowiednich aminokwasów bez konieczności modyfikacji uniwersalnego kodu genetycznego.

Proces redagowania RNA może stanowić potencjalny potranskrypcyjny mechanizm regulacyjny, modulujący ekspresję genów [5]. Może o tym świadczyć np. fakt, iż w przypadku edytowania kilku pierwotnych transkryptów u *Kinetoplastida* powstają inicjujące kodony AUG [10]. Ponadto redagowanie RNA w rejonie końca 5' może być odpowiedzialne za tworzenie sekwencji kodujących N-końcowe aminokwasy [3], które mogą być niezbędne do prawidłowego funkcjonowania białka. U *T. brucei* łańcuch oddechowy nie funkcjonuje w stadium rozwojowym, który pasożyt przechodzi we krwi kręgowca [4]. Za zróżnicowanie ekspresji elementów łańcucha, w zależności od stadium rozwojowego odpowiedzialne jest prawdopodobnie redagowanie. W ten sposób regulowana jest ekspresja genów COII (gen podjednostki II oksydazy) cytochromowej) i CYb (gen apocytochromu b) [5]. Inne RNA podlegają edytowaniu w ciągu całego cyklu rozwojowego.

Jak dotychczas niewiele wiadomo na temat mechanizmu redagowania. W przypadku zmiany znaczenia mitochondrialnych transkryptów u *Kinetoplastida* jest to prawdopodobnie proces potranskrypcyjny, zachodzący już po dodaniu do pierwotnych transkryptów odcinków poli(A), które również podlegają redagowaniu. Proces ten, zachodzący w odcinkach poli(A) jest mniej precyzyjny (różne transkrypty tego samego genu posiadają różnej długości odcinki poli(U) w obrębie poli(A) [3]). Drugi fakt przemawiający za potranskrypcyjnym zachodzeniem tego procesu to różny stosunek całkowicie i częściowo edytowanych cząsteczek mRNA odpowiadających różnym genom.

Redagowanie jest prawdopodobnie procesem polarnym, rozpoczynającym się w regionie końca 3' pierwotnego transkryptu i postępuje wraz z przesuwaniem się wieloenzymatycznego kompleksu edytującego (ang. *editosome*) w kierunku 5' [5].

Jest to najprawdopodobniej proces dwuetapowy. Pierwszy etap obejmować może endonukleolityczne rozerwanie pierwotnego transkryptu i dodanie zmiennej ilości reszt urydynowych przez 3'-terminalną transferazę urydylową. Drugi etap polega zapewne na przycięciu pierwotnych odcinków poli(U) do ostatecznych rozmiarów [3]. Na taki mechanizm wskazuje obecność dłuższych ciągów urydyn w częściowo zredagowanych cząsteczkach mRNA, w przeciwieństwie do dojrzałych cząsteczek mRNA. Kompleks enzymatyczny jest prawdopodobnie dość duży i może zawierać miejsca katalityczne dla co najmniej sześciu punktów modyfikacji RNA [3]. Dotychczas we frakcji mitochondrialnej *L. tarentolae* stwierdzono terminalną 3' transferazę urydylową i ligazę RNA.

Znacznie mniej jest danych na temat drugiego mechanizmu redagowania RNA (apolipoproteina, mitochondrialne geny u roślin). Możliwe są dwa warianty: deaminacja cytydyny lub delecja C i insercja U. Jak dotąd brak jakichkolwiek dowodów, potwierdzających którąkolwiek z tych możliwości.

Proces redagowania RNA jest prawdopodobnie ewolucyjnie stary, za czym przemawia jego występowanie u stosunkowo odległych gatunków jak *Crithidia* i *Trypanosoma* czy *Physarum*. Podobieństwo mechanizmów redagowania, u *Kinetoplastida* i *Physarum* wskazuje na ich wspólne ewolucyjne pochodzenie. Fakt stwierdzenia tego procesu w odniesieniu do transkryptu genu jądrowego (apolipoproteina) może sugerować, że redagowanie RNA jest zjawiskiem powszechnie występującym w przyrodzie. Jeżeli tak jest, to pod znakiem zapytania stoi również przewidywanie sekwencji białek jedynie na podstawie analizy sekwencji nukleotydów w genach. Możliwe jest, że część niekodujących sekwencji i pseudogenów w geno-

http://rcin.org.pl

mach eukariotycznych stanowi prawdziwe geny, w których ekspresji uczestniczy proces redagowania. Na odpowiedź czeka jeszcze wiele pytań dotyczących mechanizmów i znaczenia redagowania oraz ich rozpowszechnienia [11].

Artykuł otrzymano 15 grudnia 1989 r.
Zaakceptowano do druku 19 września 1990 r.

Piśmiennictwo

1. Berget S.T., Moore C., Sharp P.A., (1977), *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, **74**, 3171-3176.
2. Benne R., van den Burg J., Brakenhoff J.P.J., Sloof P., Van Boom J.H., Tromp M.C., (1986), *Cell*, **46**, 819-826.
3. Simpson L., Shaw J., (1989), *Cell*, **57**, 355-366.
4. Feagin J.E., Abraham M.A., Stuart K., (1988), *Cell* **53**, 413-422.
5. Benne R., (1989), *Biochim. Biophys, Acta*, **1007**, 131-139.
6. Chen S.-H, Habib G., Yang C.-Y., Gu Z.-W., Lee B.R., Weng S.-A., Silberman S.R., Cai S.-J., Deslypere J.P., Rosseneu M., Gotto A.M., Li W.-H., Chan L., (1987), *Science*, **238**, 363-366.
7. Fox T.D., (1987), *Ann. Rev. Genet.* **21**, 67-91.
8. Gualberto J.M., Lamattina L., Bonnard G., Weil J.-H., Grienenberg J.M., (1989), *Nature*, **341**, 660-662.
9. Covello P.S., Gray M.W., (1989), *Nature* **341**, 662-666.
10. Shaw J.M., Feagin J.E., Stuart K., Simpson L., (1988), *Cell* **53**, 401-411.
11. Stuart K., Feagin J.E., Abraham J.M., (1989), *Gene*, **82**, 155-160.
12. Boström K., Lauer S.J., Poksay K.S., Garcia Z., Taylor J.M., Innerarity T.L., (1989), *J. Biol. Chem.*, **264**, 15701-15708.

Ekspresja eukariotycznych genów rDNA

rDNA gene expression in *Eukaryotes*

WOJCIECH SWAT[1]
GRZEGORZ BUŁAJ[1]
JAN SZOPA[2]

Spis treści:

I. Wprowadzenie
II. Budowa eukariotycznych genów rDNA
II-1. Organizacja genów kodujących rDNA
II-2. Promotor genów rybosomowych
II-3. Sekwencje wzmacniające ekspresję rDNA
III. Metody badania transkrypcji rDNA
IV. Struktura i funkcja DNA-zależnej RNA polimerazy I
V. Izolowanie czynników transkrypcyjnych
VI. Mechanizm inicjacji syntezy rRNA
VII. Podsumowanie
VIII. Piśmiennictwo

Contents:

I. Introduction
II. The structure of the eukaryotic rDNA genes
II-1. The arrangement of rDNA gene
II-2. Gene promoters
II-3. Gene enhancers
III. Transcription assays
IV. Subunit structure and activity of DNA-dependent polimerase I
V. Isolation of transcription factors
VI. Mechanism of rDNA transcription initiation
VII. Summary

I. Wprowadzenie

Prawidłowa ekspresja genów kodujących rybosomowe kwasy nukleinowe jest bardzo istotna dla metabolizmu komórki. Poziom rybosomowego RNA zmienia się dramatycznie wraz ze zmianą wzrostu komórek oraz w odpowiedzi na szereg czynników środowiskowych [1, 2]. Podczas intensywnego wzrostu komórek synteza RNA może osiągać 80-90% całkowitej syntezy kwasów rybonukleinowych w komórce. Olbrzymia zawartość rRNA jest konsekwencją ogromnej ilości kopii genów kodujących ten specyficzny kwas rybonukleinowy. Wyróżniającą właściwością genów rRNA w porównaniu z genami pozostałymi jest również i to, że ostatecznym ich produktem jest kwas rybonukleinowy. Właściwość ta znajduje swoje odzwierciedlenie w odmienności ich budowy w porównaniu z genami kodującymi białka. Przykładowo, geny kodujące rRNA nie zawierają tak istotnych sekwencji jak sekwencje gwarantujące „oczapeczkowanie" produktu transkrypcji czy jego poliadenylacji.

Przyczyną ogromnego zainteresowania regulacją ekspresji genów rybosomowych jest łatwość ich izolowania, nieskomplikowany sposób monitorowania ekspresji ponieważ ostatecznym produktem jest rRNA oraz, jako jeden z głównych składników rybosomów odgrywają istotną rolę w syntezie białka [3, 4].

W ostatnich latach obserwuje się istotne nasilenie badań nad regulacją syntezy rybosomowego RNA. Badania zmierzają w dwóch zasadniczych kierunkach: 1. Badania strukturalne genu mające na celu ustalenie miejsc inicjacji syntezy, ustalenie położenia sekwencji promotorowych i wzmacniających transkrypcję genów oraz ustalenie funkcji sekwencji nietranskrybowanych, znajdujących się w obrębie genu. 2. Badanie

[1] mgr, [2] prof. dr hab. Instytut Biochemii, Uniwersytet Wrocławski ul. Tamka 2, 50-137 Wrocław

http://rcin.org.pl

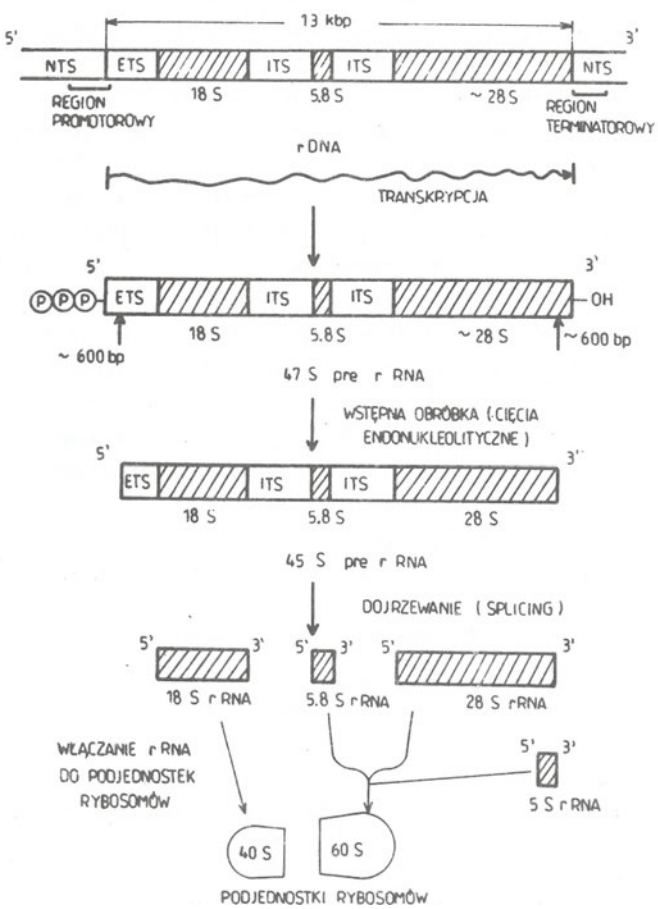
elementów białkowych zaangażowanych w procesie transkrypcji, a więc badania składu podjednostkowego enzymu DNA-zależnej RNA polimerazy I, polipeptydów zasocjowanych z polimerazą I oraz polipeptydów rozpoznających swoiście region promotora genów RNA rybosomowego.

II. Struktura eukariotycznych genów rDNA

II-1. Organizacja genów kodujących rDNA

Geny kodujące rRNA są zlokalizowane w chromosomach w miejscach określanych jako *organizator jąderka* (NOR) formujących się w interfazie. Są one miejscem transkrypcji rDNA oraz dojrzewania pre-rRNA i wstępnego składania się podjednostek rybosomów [5, 6].

Geny kodujące rRNA tworzą w genomie wspólną jednostkę transkrypcyjną powtarzającą się kilkaset razy (ułożoną w tandemy). Wielokrotność występowania tych genów umożliwia syntezę wystarczającej ilości rybosomowego RNA. U większości gatunków Eucaryota geny rDNA powtórzone są od 100 do 5000 razy w obrębie haploidalnego genomu [7]. Dla przykładu komórki ludzkie zawierają ok. 200 kopii rDNA w haploidalnym genomie obejmującym pięć różnych chromosomów. Gwarantuje to zdolność komórki do wytwarzania odpowiedniej ilości rybosomów potrzebnych do syntezy białka prowadzonej bardzo intensywnie w pewnych etapach jej rozwoju.



Ryc. 1. Schemat budowy genu rDNA i powstawania końcowych produktów jego transkrypcji.
NTS — wstawka nietranskrybowana, ETS — zewnętrzna sekwencja transkrybowana, ITS — wewnętrzna sekwencja transkrybowana

Wspólna jednostka transkrypcyjna rDNA zawiera co najmniej trzy rodzaje sekwencji nukleotydowych. Obok transkrybowanych sekwencji odnajdywanych w dojrzałych rRNA znajdują się sekwencje nietranskrybowane oraz sekwencje obecne w pierwotnym transkrypcie, które ulegają wycięciu w czasie jego dojrzewania. Nietranskrybowane wstawki (*NTS — non-transcribing spacer*) długości 31 kz rozdzielają od siebie jednostki transkrypcyjne ułożone w tandemach. W sklonowanych sekwencjach NTS wykazano obecność wielu fragmentów odpowiedzialnych za regulację ekspresji rDNA [8].

Między innymi znaleziono w NTS cztery sekwencje Alu (rodzina powtarzających się sekwencji rozsianych w genomie ssaków), sekwencje bogate w adenozynę przypuszczalnie odpowiedzialne za „zginanie" DNA oraz sekwencje bogate w pary GC, mogące występować jako lewoskrętny DNA.

Na Ryc. 1 przedstawiono schematycznie strukturę genów rDNA oraz dojrzewanie 45S rybosomowego RNA prekursora dla 18S, 5.8S i 28S rRNA transkrybowanego przez DNA-zależną RNA polimerazę I (Pol. I).

II-2. Promotor genów rybosomowych

Analizując strukturę genów rDNA ustalono, że region promotora jest swoisty gatunkowo. Między różnymi gatunkami ssaków zauważono jednak w budowie tego odcinka DNA strukturalne podobieństwo. Wskazuje się na co najmniej dwie domeny istniejące w obrębie sekwencji promotorowych: rdzeń promotora istotny dla prawidłowej inicjacji transkrypcji będący prawdopodobnie obszarem gdzie następuje, podobnie jak u Prokaryota izomeryzacja kompleksu polimeraza — promotor z „zamkniętego" do „otwartego" tj. do częściowo rozdysocjowanych dwóch nici DNA, oraz drugi region określany jako UPE (upstream promoter element) wymagany dla transkrypcji *in vivo* [9].

Badania określające położenie i sekwencje promotora przeprowadzono przy użyciu serii mutantów wykazujących defekty w miejscu inicjacji transkrypcji. Mutanty tego typu skonstruowano dla rDNA z wielu organizmów takich jak: *Acanthamoeba* [10, 11, 12], mysz [13, 14, 15], człowiek [16], *Drosophila* [17, 18], żaba [19, 20], *Tetrahymena* [21] i drożdże [22]. Dla oocytów *Xenopus laevis* miejsce promotorowe znajduje się w pozycji od -39 (w górę od miejsca startu transkrypcji oznaczonego jako +1) do +6. Sekwencje odpowiedzialne za inicjację transkrypcji rDNA w ko-

http://rcin.org.pl

mórkach mysich są zlokalizowane w regionie od -39 do +9. Należy jednak podkreślić, że nie są to ścisłe granice ponieważ można obserwować wzrost poziomu swoistej transkrypcji przy zwiększającej się długości promotora do pozycji -45 a nawet -100 i -140 [23]. U szczura, oprócz rdzenia promotora znajdującego się między -39 a +6 wykazano, że istnieje dodatkowe miejsce inicjacji transkrypcji w rejonie -731 do -719. Ta 13 nukleotydowa sekwencja jest w 100% homologiczna z częścią promotora -18 do -6 [24].

Promotor dla ludzkiego rDNA zlokalizowany jest w pozycji -140 do +18, ale obserwowano efekt swoistej transkrypcji także przy użyciu promotora odpowiadającego sekwencji -50 do +5 [25]. Sekwencja promotorowa dla muszki owocowej *Drosophila* rozciąga się w przedziale od -40 do +4 [17, 18]. U drożdży promotor odpowiada sekwencji -32 do - 10 [22].

W najlepiej obecnie poznanym układzie transkrypcyjnym rDNA u *Acanthamoeba* promotor zlokalizowano w pozycji od -29 do +5 [11].

Jak już wspomniano rdzeniowe regiony promotorów są w większości badanych organizmów swoiste gatunkowo, daje się jednak zauważyć strukturalne podobieństwo między nimi. Szczegółowe wyniki badań sekwencji wykazały, że wszystkie kręgowce zawierają w regionie promotora guanozynę w pozycji -16 i -17 [26]. Wskazuje się na istotne znaczenie tego nukleotydu w inicjacji syntezy RNA sugerując, że co najmniej jeden z czynników wymaganych w transkrypcji rDNA lub/i enzym polimeryzujący (Pol I) swoiście oddziaływuje z tym regionem [26, 27].

Ponadto istnieje druga sekwencja, bardziej odległa od miejsca startu transkrypcji, mająca istotny wpływ na poziom swoistej transkrypcji. Określa się ją jako *„intrapromoter element"* — IPE. Jest ona zlokalizowana w rejonie -110 do -140. Przypuszczalna rola tej sekwencji polega na stabilizowaniu kompleksu inicjacyjnego [28, 29].

Poza rdzeniem promotora, również sekwencje położone po stronie jego 5'końca (np. UPE) są konieczne dla wydajnej transkrypcji [16, 26, 29-31]. Sekwencje graniczne po stronie 5' tej domeny leżą pomiędzy pozycjami nukleotydów -250 i -143, w zależności od metody oznaczania tego położenia. Region ten jest wymagany dla utworzenia stabilnego kompleksu preinicjacyjnego. Co najmniej dwa czynniki izolowane z komórek ludzkich oraz szczurzych oddziałują z regionem pomiędzy -150 do -50. Przypuszcza się, że sekwencje UPE zwiększają szybkość przesuwania się kompleksu transkrypcyjnego z miejsca preinicjacyjnego do inicjacyjnego z utworzeniem „otwartego" kompleksu promotor-polimeraza-czynniki transkrypcyjne.

Z sekwencją UPE sąsiaduje trzynastonukleotydowy fragment homologiczny do tych elementów które sterują terminacją prekursora rybosomowego RNA [32]. Fragment ten, znajdujący się w pozycji około -167 u szczura, oznaczono jako T_0. Podobny fragment oznakowany T_3 odnaleziono w rDNA komórek X laevis. Element ten przypuszczalnie reguluje ekspresję genu w ten sposób, że nie zezwala na kontynuację transkrypcji genu położonego w górę (poprzedzającego) od miejsca jego lokalizacji oraz nie zezwala na inicjację transkrypcji z UPE jako elementu promotorowego. Delecja sekwencji promotorowej nie powoduje wyłączenia promotora. Wydaje się zatem, że region terminatorowy nie jest wyłącznie miejscem zakończenia transkrypcji, ale działa również jako część mechanizmu umożliwiającego natychmiastowe rozpoczęcie transkrypcji następnego genu rRNA poprzez automatyczne przesunięcie RNA polimerazy I (Pol I) do miejsca inicjacji transkrypcji [32, 33]. Taki mechanizm ekspresji genów rybosomowych określa się nazwą *Readthrough enhancement*. Przyjęcie tej interpretacji pozwala na lepsze zrozumienie wzmacniającej ekspresję roli sekwencji UPE.

II-3. Sekwencje wzmacniające ekspresję rDNA

Poziom transkrypcji genów rDNA jest między innymi regulowany przez cis-działające sekwencje rozlokowane głównie w nietranskrybowanych wstawkach (NTS — *nontranscribed spacer*). Wykazano, że sekwencje NTS *Xenopus*, drożdży i *Drosophila* zawierają elementy które uwydatniają transkrypcję w obecności kompletnego promotora. Dwa elementy tej sekwencji t.j. powtarzająca się sekwencja „60/81 bp" oraz tzw. „Bam islands" okazały się homologiczne do promotora 45S, co sugerowało ich istotną rolę w procesie transkrypcji [34, 35]. Te odległe sekwencje leżące w górę od miejsc inicjacji wspomagają wiązanie się swoistych białek z regionami promotorowymi, wzmagając intensywność transkrypcji.

Po raz pierwszy efekt wzmacniania transkrypcji rDNA przez sekwencje odległe od miejsca startu został opisany przez Mossa'a [34]. Geny rRNA wprowadzone przez mikroinjekcję do oocytów *Xenopus laevis* były transkrybowane z różną szybkością, w zależności od wielkości wstawek leżących „w górę" od genów kodujących.

Seria doświadczeń przeprowadzanych w laboratorium R e e d e r a z użyciem plazmidów zawierających promotor oraz powtarzające się w NTS sekwencje „60/81 bp" wskazała na to, że elementy „60/81 bp" odgrywają zasadniczą rolę we wzmacnianiu transkrypcji rDNA [36, 37]. Zostały one nazwane elementami wzmacniającymi dla polimerazy I [37, 38]. Molekularny mechanizm działania tych elementów nie jest całkowicie wyjaśniony. Sekwencje te posiadają około 90% homologii strukturalnej z sekwencją od -119 do -72 regionu promotorowego genów rDNA. Ten właśnie region promotora prawdopodobnie wiąże swoiście białkowe czynniki regulujące aktywność polimerazy I [37, 38].

Stwierdzono, że mikroinjekcja do jądra dodatkowych bloków zawierających powtórzone elementy

http://rcin.org.pl

„60/81 bp" stwarza konkurencję dla sekwencji sprzężonych z funkcjonalnymi genami przez wiązanie czynników transkrypcyjnych działających w układzie trans [36]. Sekwencje ..60/81 bp" są specyficznymi wzmacniaczami tylko dla genów transkrybowanych przez polimerazę I [39]. Okazało się również, że opisywane sekwencje przejawiają kumulujące się, wraz ze wzrostem ich powtórzeń, działanie wzmacniające transkrypcję jedynie w obecności kompletnego promotora.

Obserwacja ta sugeruje, że funkcja sekwencji „60/81 bp" może polegać na wiązaniu czynników transkrypcyjnych ułatwiających następnie wiązanie się polimerazy I z rdzeniem promotora. Zjawisko to jest opisywane albo jako efekt kooperatywności wiązania polimerazy oraz białkowych czynników transkrypcyjnych do specyficznych sekwencji rDNA, albo też jako efekt tzw. „nasuwania się" (*sliding*) enzymu polimeryzującego na rdzeń promotora [39].

Zdolność sekwencji „60/81 bp" do uwydatniania poziomu transkrypcji okazała się niezależna od orientacji i odległości od miejsca startu transkrypcji [40-43]. Dla przykładu sekwencje wzmacniające transkrypcję u drożdży są zlokalizowane w przedziale sekwencji od -2230 do -2420 podczas gdy u szczura nieco powyżej pozycji -280 w obrębie fragmentu oznakowanego UAS (*upstream activator element*), rozpoznawanego swoiście przez białka znajdujące się w ekstrakcie jądrowym [44].

III. Metody badania transkrypcji rRNA

Ogromny postęp w zakresie metod stosowanych w biologii molekularnej możliwił badania swoistej transkrypcji. Przy użyciu homologicznej matrycy zawierającej fragment rDNA, żelu sekwencyjnego i techniki autoradiografii można analizować uzyskiwane transkrypty. W badaniach transkrypcji rDNA stosuje się najczęściej metodę *run off*, w której powstały transkrypt posiada z reguły kilkaset par zasad.

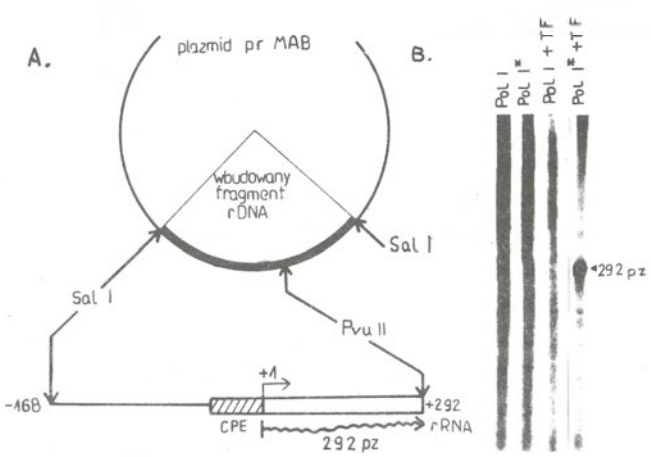
Matryce używane do transkrypcji zawierają zdefiniowany fragment rDNA z jego promotorem, wbudowany w plazmid. Liniową formę matrycy otrzymuje się po trawieniu plazmidu jednym z enzymów restrykcyjnych w taki sposób, aby 3'końcowy fragment zawierał określonej długości sekwencję rDNA poprzedzoną sekwencją promotora. Synteza rRNA kończy się wraz z osiągnięciem przez układ transkrypcyjny końca cząsteczki plazmidu. Do badania czynników transkrypcyjnych rDNA w komórkach HeLa używano fragmentu rDNA wyciętego enzymem restrykcyjnym Bam H1 lub Xho1. W czasie transkrypcji powstawały fragmenty rRNA o długości odpowiednio 1500 lub 1360 par zasad [45]. W badaniach transkrypcji mysiego rRNA często stosowano plazmid prM 600 zawierający fragment ca. 600 pz rDNA powstały po trawieniu Pvu II. Odcinek ten trawi się jeszcze dodatkowo Sma I lub Eco RI tak, że powstałe transkrypty mają odpowiednio 155 i 297 par zasad [46].

Do transkrypcji rDNA u *Acanthamoeba castellani* stosowano sklonowany fragment rDNA wbudowany w plazmid pBR 322. Produktem transkrypcji był fragment rRNA o długości 495 pz [47, 48].

Powszechna obecnie technika *run off* używana do oznaczania swoistej transkrypcji posiada wszakże jeden istotny mankament — jest zbyt czasochłonna. W najlepszym razie wynik eksperymentu otrzymuje się po 24 godzinach od jego rozpoczęcia, utrudnia to znacznie analizę oczyszczonych, zwykle w kilkunastoetapowym postępowaniu enzymu i czynników transkrypcyjnych.

Biorąc pod uwagę niezwykłą labilność czynników transkrypcyjnych, nawet przechowywanych w -70°C, staje się zrozumiałym ograniczone zastosowanie techniki *run off*. Dlatego też poszukuje się nowych, szybkich i pewnych metod oznaczania tej aktywności.

W ostatnich latach rozwinięto dwie metody z powodzeniem zastosowane do badania czynników białkowych swoiście oddziałujących z sekwencjami regulatorowymi genów rDNA, a mianowicie *band — shift*



Ryc. 2. A. Schemat budowy plazmidu prMAB oraz fragmentu mysiego genu rDNA używanego w badaniach swoistej transkrypcji.
B. Autoradiogram produktów transkrypcji liniowej formy plazmidu prMAB.
Ścieżka Pol I — do testu używano oczyszczonego preparatu jądrowej polimerazy I
Ścieżka Pol I* — do testu używano częściowo oczyszczonego preparatu polimerazy I izolowanego z ekstraktu S-100
Ścieżka Pol I + TF — do testu użyto oczyszczonej jądrowej polimerazy I uzupełnionej o czynniki swoistości transkrypcyjnej
Ścieżka Pol I* + TF — w teście stosowano polimerazę I częściowo oczyszczoną, pochodzącą z ekstraktu S-100 uzupełnioną o czynniki swoistości transkrypcyjnej.
292 pz — oczekiwany produkt transkrypcji plazmidu prMAB o wielkości 292 par zasad

http://rcin.org.pl

assay oraz *protection assay (footprinting)*. Założeniem tych technik jest wskazanie sekwencji DNA, oddziałujących swoiście z czynnikami transkrypcyjnymi oraz enzymem polimeryzującym [49-52]. Techniki te umożliwiły wykazanie swoistego oddziaływania dwóch czynników SL-1 i SF-1, wyizolowanych z komórek szczura, z sekwencją UPE. Technika *band — shift assay* posłużyła do izolowania i oczyszczenia polipeptydu oznaczonego p16, podobnego do białek grupy HMG, wiążącego się do sekwencji NTS i aktywującego transkrypcję [53].

IV. Struktura i funkcja polimerazy I

W komórkach eukariotycznych transkrypcja genów rybosomowych odbywa się z udziałem DNA-zależnej RNA polimerazy I (Pol I). W przeciwieństwie do pozostałych jądrowych polimeraz, Pol I syntetyzuje pojedynczy typ RNA, a mianowicie rRNA.

Aktywność Pol I w różnych komórkach odzwierciedla ich stan metaboliczny: i tak, więcej enzymu zawierają komórki regenerującej wątroby od nieregenerującej. Większą aktywnością enzymu odznaczają się komórki limfocytów T i B stymulowane mitogenami od niestymulowanych: zwiększonym poziomem aktywności Pol I odznaczają się komórki nowotworowe w porównaniu do ich normalnych partnerów. Podwyższona aktywność enzymu w cytowanych przypadkach jest wynikiem zarówno aktywacji enzymu (np. przez fosforylację), jak i podwyższonej ilości kopii enzymu w komórce, co stwierdzono technikami immunologicznymi [6, 54, 55].

Techniką immunocytochemiczną, stosując przeciwciała anty-Pol I, ustalono, że ilość enzymu zaangażowanego w transkrypcji rDNA *in situ* w regenerującej wątrobie czy w komórkach hepatoma *Morrisa* była zdecydowanie wyższa niż w komórkach normalnych. Działanie aktynomycyną D na te komórki powodowało dysocjację enzymu od rybosomowego DNA. Stwierdzono również, że niewielka ilość enzymu pozostawała związana z organizatorem jąderka nawet podczas mitozy. Ustalono, że Pol I jest zlokalizowana w fibrylarnych centrach jąderka, oraz że jednym z objawów reaktywności erytrocytów kurczęcia po ich fuzji z komórkami mioblastycznymi szczura jest migracja szczurzej Pol I do jąder kurczęcia i inicjacja transkrypcji genów rybosomowych [56-58].

Polimerazę I wyizolowano z wielu źródeł, enzym wykazuje strukturę podjednostkową, a ilość podjednostek waha się od 4 do 16 w zależności od źródła i metody izolacji. I tak Pol I izolowana z nowotworowych komórek ssaków zawierała od 6 do 8 polipeptydów, enzym izolowany z grasicy cielęcej i wątroby szczura 4 do 6, natomiast izolowany z drożdży zawierał od 11 do 16 różnych polipeptydów. Cechą wspólną zdecydowanej większości preparatów jest obecność dwóch polipeptydów o Mcz 190000 i 120000-135000 odznaczających się stechiometrią 1:1, wśród pozostałych polipeptydów obserwowano dużą zmienność zarówno masy cząsteczkowej jak i zawartości w enzymie.

Niedawno sklonowano gen dla największej podjednostki Pol I z drożdży. Gen zawiera sekwencję kodującą polipeptyd o masie cząsteczkowej 186.270 [59]. Chociaż powyższe dane sugerują minimalną ilość polipeptydów odpowiedzialnych za nieswoistą syntezę RNA (żaden z tych enzymów nie inicjuje swoiście ekspresji rDNA), to jednak trudno jest w dalszym ciągu ocenić minimalny skład polimerazy I oraz wskazać, które z polipeptydów towarzyszących dużym podjednostkom mają znaczenie regulatorowe w transkrypcji. Należy podkreślić, że co najmniej dwie aktywności enzymatyczne są ściśle, chociaż odwracalnie zasocjowane z polimerazą I, a mianowicie N II kinaza białkowa modyfikująca Pol I i wzmagająca aktywność polimeryzującą oraz topoizomeraza I [60, 61]. W kilku niezależnych pracach udokumentowano ścisły związek topoizomerazy I z ekspresją genów rybosomowych [62]. Chociaż w dalszym ciągu dokładna struktura Pol I nie jest znana, to jednak obserwuje się postęp w tym zakresie. Wykazano, że enzym izolowany z hepatomy *Morrisa* w warunkach sterylnych i wzmożonego reżimu temperaturowego zawierał tylko dwa polipeptydy o Mcz 190000 i 120000. Analiza porównawcza map peptydowych tych polipeptydów, z polipeptydów o niższej masie cząsteczkowej, wykazała ich ogromne podobieństwo. Na tej podstawie sugeruje się, że enzym korowy zbudowany jest z dwóch podjednostek, a pozostałe polipeptydy o niższej masie cząsteczkowej są produktami ich degradacji prawdopodobnie generowanymi w procesie izolacji enzymu [63]. Wcześniej już obserwowano samodegradację podjednostki 190-kDa do polipeptydów 14 — 18 kDa [64]. Na uwagę zasługuje również wykazanie w komórkach limfocytów B polipeptydu 240 kDa rozpoznawanego przez poliklonalne przeciwciała anty-polimeraza I. Mapy peptydowe tego największego polipeptydu wykazują podobieństwo do map peptydowych podjednostek 190 kDa i 120 kDa. Polipeptyd 240 kDa nie wykazuje żadnej aktywności polimeryzującej [63]. Wydaje się, że polimeraza I jest syntetyzowana w formie prekursora o masie cząsteczkowej 240 kDa i ulega ograniczonej proteolizie do aktywnego enzymu polimeryzującego. Jeżeli degradacja taka zachodzi to musi być ściśle kontrolowana, bowiem preinkubacja enzymu w temperaturze zbliżonej do pokojowej prowadzi do powstania polipeptydów o niskich masach cząsteczkowych z równoczesną utratą aktywności polimeryzującej. Polipeptydy o niskiej masie cząsteczkowej wykazują wysokie powinowactwo do natywnej formy Pol I hamując jej aktywność [64]. Być może jest to naturalny mechanizm wyłączania enzymu polimeryzującego.

Istnienie prekursora enzymu polimeryzującego zostało dobrze udokumentowane. Duża podjednostka RNA polimerazy II występuje w kilku formach a mia-

http://rcin.org.pl

nowicie II0 (240 kDa), IIA (190 kDa) i IIB (170 kDa). Forma IIB tworzy się z IIA wskutek ograniczonej proteolizy. Sugeruje się, że forma II0 jest prekursorem aktywnego enzymu [65].

Jak już wspomniano żaden z dotychczasowych oczyszczonych jądrowych preparatów Pol I nie jest zdolny do swoistej inicjacji syntezy rRNA nawet w obecności odpowiednich czynników transkrypcyjnych. Sugeruje to istnienie unikalnej formy enzymu która została zagubiona lub zmodyfikowana w procesie izolacji i oczyszczania. Istnieje możliwość, że enzym zaangażowany w swoistą transkrypcję rDNA jest różny pod względem struktury molekularnej lub/i obszaru zmian posttranslacyjnych od enzymu uczestniczącego w nieswoistej transkrypcji [66, 67]. Jeśli tak, to powinno być możliwym rozdzielenie obu aktywności. W wielu laboratoriach przeprowadzono takie próby i w rezultacie ustalono, że zastosowane standartowe metody biochemiczne nie dają zadowalającego wyniku ze względu na olbrzymi nadmiar aktywności nieswoistej Pol I. Wyliczono, że swoista aktywność transkrypcyjna stanowi mniej niż 1% całkowitej aktywności Pol I [S z o p a i R o s e, dane nieopublikowane].

Ogólnie znanym jest, że chociaż w cytoplazmie komórek wykazano obecność wszystkich polipeptydów budujących Pol I to jednak aktywna forma enzymu znajduje się tylko w jądrze komórkowym. Nadto pewna część jądrowej Pol I jest związana z DNA rybosomowym i mógłby to być enzym w pełni „ukształtowany", zdolny do swoistej syntezy rRNA. Zatem wydawało się prawdopodobnym, że standardowo przygotowywany ekstrakt komórkowy (komórki ekstrahowane 100 mM KCl) nazwany w literaturze S-100 (komórki ekstrahowane 100 mM KCl) zdolny do swoistej transkrypcji genów rybosomowych powinien zachować chociaż część polimerazy I w formie nukleoproteidu zawierającego enzym swoisty. Dla sprawdzenia takiej hipotezy rozdzielono ekstrakt S-100 komórek mysiej białaczki L 1210 w żelu agarozowym i po rozdziale analizowano pod względem lokalizacji kwasów nukleinowych w żelu, eluowane z żelu makrocząsteczki analizowano pod względem ich zdolności inicjacji swoistej transkrypcji oraz pod względem zawartości polipeptydów rozpoznawanych przez poliklonalne przeciwciała anty Pol I [68]. Enzym zdolny do swoistej transkrypcji rDNA zlokalizowano we frakcji wędrującej wspólnie z DNA. Enzym nieswoisty wędrował w większości w kierunku przeciwnym oraz część wędrowała wspólnie z RNA. Ustalono, że enzym nieswoisty zawierał głównie podjednostkę 190 kDa natomiast enzym swoiście transkrybujący rDNA zawierał polipeptydy 240 kDa i 160 kDa.

Otrzymane dane w połączeniu z wyżej cytowaną analizą map peptydowych sugerują, że enzym swoiście transkrybujący rDNA zawiera w swym składzie polipeptyd 240 kDa i nie posiada polipeptydu 190 kDa. Zatem enzym swoisty jest subformą Pol I różniącą się składem podjednostkowym.

V. Izolowanie czynników transkrypcyjnych

Równolegle z badaniem roli poszczególnych podjednostek polimerazy I oraz polipeptydów zasocjowanych z enzymem w syntezie RNA podjęto badania szczególnie w ostatnich latach nad opracowaniem metody izolacji i charakterystyką białek uczestniczących w procesie swoistej transkrypcji rDNA. Wstępne doświadczenia polegały na frakcjonowaniu ekstraktów komórkowych S-100 (komórki ekstrahowane 100 mM KCl) lub jądrowych tak, aby oddzielić aktywność polimeryzującą od czynników odpowiedzialnych za swoistą inicjację syntezy rRNA [46, 69].

I tak rozdzielono ekstrakt S-100 na kolumnie z fosfocelulozą na cztery frakcje: „A" (eluowana 0.1 M KCl), „B" (0,1—0,4 M KCl), „C" (0,4—0,6 M KCl) i „D" (0,6—1.0 M KCl) [70]. Żadna z pojedyńczych frakcji nie jest zdolna do swoistej transkrypcji rDNA, zauważono jednak, że frakcja C posiada aktywność polimeryzującą, a uzupełniona o frakcję D swoiście transkrybuje gen rybosomowy. Frakcja A posiada właściwość zapobiegania degradacji RNA i można ją zastąpić inhibitorem RNazy (*RNasin*) [71]. Frakcja B odznacza się właściwością supresji nieswoistej syntezy RNA.

W wielu laboratoriach podjęto prace nad dokładną charakterystyką czynników C i D izolowanych z różnych źródeł. Stwierdzono, że czynnik C współoczyszcza się z polimerazą I [41, 45, 47, 71]. Oczyszczona w kilku etapach chromatograficznych (DE celuloza, DNA celuloza, heparyna-agaroza) i wirowaniu w gradiencie glicerolowo-sacharozowym frakcja C (*C factor*), analizowana w żelu poliakryloamidowym daje kilka pasm białkowych przy czym dwa z nich posiada Mcz powyżej 100 kDa, tj. 190 kDa i 120 kDa [66]. Masa cząsteczkowa obu polipeptydów jest identyczna z masą cząsteczkową jądrowej Pol I. Ponadto poliklonalne przeciwciała anty Pol I rozpoznają większość polipeptydów (w tym dwa największe) obecnych we frakcji C, również IgG anty-Pol I hamują ekspresję rDNA. Stąd wysunięto przypuszczenie, że frakcja C jest polimeryzą I. Wyliczono, że enzym ten (*factor C*) uzupełniony o czynniki transkrypcyjne jest w stanie specyficznie ekspresjonować rDNA tylko w 1% [S o l l n e r - W e b b, dane nieopublikowane], sugeruje się zatem, że tylko znikoma część enzymu zawartego we frakcji C jest enzymem zaangażowanym w specyficznej transkrypcji rDNA. Wysunięto przypuszczenie, że enzym specyficznie transkrybujący rDNA jest polimerazą I kowalencyjnie zmodyfikowaną (np. poliADP rybozylowany lub glikozylowany).

http://rcin.org.pl

Wiele uwagi poświęcono również dokładnej charakterystyce czynnika D. Wcześniejsze badania dowiodły, że posiada on swoistość gatunkową, zatem należało oczekiwać, iż jest to białko (lub grupa białek) specyficznie wiążące się z sekwencjami odpowiedzialnymi za inicjację syntezy rRNA w genomie. Pomimo ogromnego nakładu pracy, do chwili obecnej udało się wstępnie oczyścić zaledwie kilka czynników transkrypcyjnych. Podstawową trudność sprawia metoda detekcji oczyszczanego białka. Analiza aktywności biologicznej oczyszczonej frakcji D wymaga uzupełnienia o frakcję C, następnie wykonania tekstu *run off* i ilościowego oznaczenia nowosyntetyzowanego RNA. To sprawia, że analiza jest długotrwała i uciążliwa. Drugi nie mniej ważny problem, jaki napotyka się przy izolacji czynników transkrypcyjnych, to ich ogromna labilność i bardzo niski poziom w komórce (do 500 kopii na 1 komórkę) [45]. Przykładowo, ekstrakt S-100 z komórek mysich przechowywany w -70°C traci do 30% swojej aktywności w czasie 24 h, przechowywany w -20°C traci całkowicie aktywność swoistej transkrypcji w ciągu 1 doby.

Pomimo trudności związanych ze sposobem detekcji oraz labilnością udało się wydzielić kilka czynników biorących udział w inicjacji transkrypcji rDNA. I tak w laboratorium Pauliego wydzielono czynnik transkrypcyjny z *Acanthamoeba* oznakowany TIF (*transcription initiation factor*) [67]. Wyizolowane białko posiada masę Mr ok. 300 kDa.

Kolejnym wydzielonym czynnikiem transkrypcyjnym jest frakcja Sl1 z komórek HeLa [45]. W metodzie preparacji zastosowano podwójną chromatografię na złożu Heparyna—agaroza i sączenie molekularne na Ultragel ACA34 oraz chromatografię powinnowactwa na rDNA. Oczyszczony tą metodą czynnik SL1 miał Mr ok. 100 kDa i posiadał ok. 100 tysięcy razy większą aktywność właściwą niż w ekstrakcie z całych komórek [45]. W tym samym laboratorium oczyszczono drugi polipeptyd oddziałujący z promotorem rDNA i nazwano go czynnikiem UBF1 (*upstream binding factor*) [72].

Udało się również wyizolować białka biorące udział w procesie inicjacji i terminacji syntezy rRNA u myszy. Stosując pięć różnych kolumn, uzyskano homogenny preparat czynnika transkrypcyjnego o Mr 220 kDa wiążącego się z promotorem i nazwano TIF-IB [73]. Ta sama grupa badaczy, dzięki chromatografii powinowactwa na unieruchomionym rDNA, oczyściła do stanu homogenności białko odpowiedzialne za proces terminacji syntezy rRNA. Polipeptyd ten o Mr 105 kDa posiada domenę odporną na działanie proteinaz, wiążącą się z DNA.

VI. Mechanizm inicjacji syntezy rRNA

Już w latach 70-tych wiadomo było, że traktowanie komórek takimi inhibitorami syntezy białka jak cykloheksymid czy puromycyna powoduje szybki spadek syntezy rRNA. Zauważono przy tym, że nieswoista aktywność polimerazy I nie ulegała obniżeniu [74-76]. Z danych tych wywnioskowano, że swoista transkrypcja rDNA wymaga nie samej tylko polimerazy I, ale również pewnych czynników będących niestabilnymi, szybko degradowanymi w komórce białkami, które regulują działanie enzymu polimeryzującego.

Do chwili obecnej zgromadzono już wiele danych na temat mechanizmu regulacji transkrypcji rDNA przez swoiste czynniki polipeptydowe, wiążące się z sekwencjami regulatorowymi w obrębie rDNA.

Ze względu na prostotę budowy najlepiej dotychczas poznanym jest układ transkrybujący rDNA u *Acanthamoeba*. Z komórek tych wydzielono polipeptyd oznaczony TIF wiążący się z regionem -67 do -17 promotora rDNA tworząc kompleks preinicjacyjny. W bezpośrednim sąsiedztwie tego regionu wiąże się Pol I (-16 do +18). Interesującym jest, że enzym nie jest zdolny do bezpośredniego wiązania się z DNA. Wiązanie to zachodzi po wcześniejszej interakcji Pol I z czynnikiem TIF a następnie kompleks Pol I — TIF dysocjuje z przeniesieniem Pol I do obszaru -16 — +8 promotora i tworzy się kompleks inicjacyjny, którego cechą charakterystyczną, podobnie jak u *Prokaryota*, jest miejscowa denaturacja kilku par zasad DNA w pobliżu miejsca startu transkrypcji. Dostarczenie trifosforanów rybonukleotydów inicjuje proces transkrypcji rDNA. W przeciwieństwie do Pol I lokalizacja czynnika TIF nie ulega zmianie co umożliwia natychmiastowe rozpoczęcie transkrypcji przez następną cząsteczkę Pol I [77].

Nie wiadomo czy i jakim zmianom ulega Pol I nabywając właściwości swoistej transkrypcji rDNA.

Podobny chociaż nieco bardziej skomplikowany mechanizm inicjacji syntezy rRNA przedstawiono dla organizmów ssaków. I tak częściowo oczyszczony, swoisty gatunkowo czynnik SL-1 z komórek ludzkich jest odpowiedzialny za specyficzną transkrypcję rDNA. Czynnik ten nie tworzy kompleksu z DNA. Inny czynnik UBF-1 z tych komórek wiąże się z fragmentem rDNA w pozycji od -80 do -110. Kompleks UBF-1 — DNA wiąże następnie czynnik SL-1 [78, 79]. Obecność analogicznych czynników wykazano również u innych organizmów. Czynnik SL-1 wykryto w komórkach szczura, czynnik ten wymaga jeszcze obecności czynnika SF-1 do inicjacji swoistej transkrypcji rDNA [R o t h b l u m, dane nieopublikowane]. W komórkach mysich z zastosowaniem techniki *footprinting* (trawienie DNA DNazą I) wykazano, że czynnik transkrypcyjny TFID wiąże się z sekwencjami promotora od -140 do -40 oraz regionem rdzeniowym promotora od -40 do -12 pozycji, przy czym najpierw wiązanie następuje z sekwencją rdzenia. Interakcja TFID z regionem promotora ma charakter pośredni: a mianowicie z matrycą wiąże się najpierw inny czynnik TFIA, a następnie z nim wiąże się TFID. Dopiero po utworzeniu takiego kompleksu układ jest

http://rcin.org.pl

zdolny do przyłączenia Pol I. Wykazano ponadto, że czynnik TFID jest swoisty dla danego gatunku, czynnik izolowany z komórek ludzkich nie wiąże się z promotorem genu rDNA gryzoni i *vice versa*.

W innym laboratorium [73] wyizolowano z komórek mysich czynnik nazwany TIF-IB. Czynnik ten inicjuje swoistą transkrypcję i wiąże się z regionem promotora od -39 do -1. Wiązanie to następuje jedynie wtedy gdy obecna jest sekwencja UCE leżąca około 100 par zasad w górę od rdzenia promotora. Sądzić należy, że TIF-IB zawiera w sobie oba wyżej wzmiankowane czynniki: TFIA i TFID.

Wszystkie dotychczas opisane w literaturze przykłady inicjacji transkrypcji rDNA zakładają udział zaledwie dwóch do trzech, obok Pol I, czynników inicjujących. Dodać należy, że pomimo wysokiego stopnia oczyszczenia tych czynników (5000 i więcej razy) żadnemu z zajmujących się tym zagadnieniem laboratoriów nie udało się wydzielić homogennych polipeptydów odpowiedzialnych za inicjację transkrypcji. Każdy ze wzmiankowanych czynników zawiera w najlepszym razie co najmniej kilka różnych pod względem masy cząsteczkowej polipeptydów. Stąd trudno ocenić jak wiele i jakie polipeptydy uczestniczą bezpośrednio w transkrypcji rDNA. Istnieje zatem potrzeba rozwoju innych niestandardowych metod rozdziału makrocząsteczek do ostatecznego rozwiązania tego zagadnienia. Jak już podkreślono w poprzednim rozdziale obok sekwencji promotora rdzeniowego i sekwencji UPE, istotne znaczenie dla regulacji transkrypcji rDNA posiada sekwencja terminatora leżąca w bezpośrednim sąsiedztwie sekwencji UPE. Dotychczas poznano kilka tego typu sekwencji oznakowanych T_0 lub T_3 u *Xenopus laevis* [80] lub *Sal box* w komórkach mysich. *Sal box* stanowi 3'końcową część fragmentu NTS o sekwencji AGGTCGACCAGT/AA/TNTCCG [73]. Sekwencje te są rozpoznawane przez polipeptydy takie jak Rib2 z *Xenopus* lub polipeptyd 105 kDa z komórek mysich.

Tylko kompleks odpowiedniego polipeptydu z sekwencją terminatorową wyłącza transkrypcje. Jeżeli Pol I transkrybująca gen poprzedni nie ulegnie zatrzymaniu na sekwencji terminatorowej genu następnie transkrybując sekwencje NTS, to dochodzi do wyłączenia promotora tego genu *(promoter occlusion)* przez rozbicie kompleksu preinicjacyjnego, tj. kompleksu czynnika transkrypcyjnego z regionem promotorowym (UPE) [81, 82]. Uważa się, że najważniejszym zadaniem sekwencji terminatorowej w kompleksie ze swoistym białkiem jest zatrzymanie enzymu polimeryzującego, jego dysocjacja od DNA i przekazanie enzymu do pobliskiego miejsca UPE związanego z czynnikami transkrypcji w celu inicjacji syntezy rRNA na następnym genie.

Polskie Towarzystwo Biochemiczne wydało Monografię Biochemiczną pod redakcją prof. dr Moniki Jeżewskiej:

IWONA ŻAK
Glikoproteiny ssaków

Do nabycia w Zarządzie Głównym Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, ul. Freta 16, 00-227 Warszawa, cena 10000 zł.

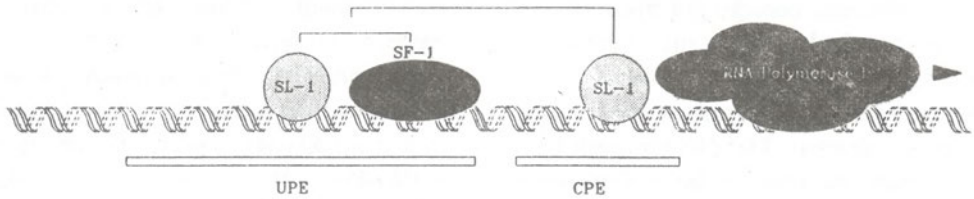
VII. Podsumowanie

W niniejszym artykule przedstawiono najwcześniejszy etap transkrypcji tj. inicjację transkrypcji genów rybomosowych. Do najważniejszych elementów strukturalnych tego procesu należy zaliczyć: 1. sekwencję rdzenia promotora położoną w przedziale od ok. -40 par zasad do miejsca inicjacji, która bezpośrednio steruje syntezą rRNA i jest wystarczającą do jej inicjacji, 2. sekwencję wzmacniającą transkrypcję położoną ok. 100 par zasad w górę od rdzenia promotora (UPE, UCE), która nie jest niezbędna do inicjacji syntezy, ale jest wymagana dla wydajnej transkrypcji, 3. krótką 7 do 13 par zasad sekwencję terminatorową położoną w obrębie UPE, której zadanie wynika z tandemowej organizacji genów rDNA, która reguluje właściwe zakończenie transkrypcji genu poprzedniego i determinuje prawidłowe rozpoczęcie transkrypcji genu następnego.

Prawidłowa ekspresja genów rDNA wymaga, obok elementów strukturalnych, określonych czynników białkowych. Do najważniejszych zaliczyć należy enzym DNA — zależną RNA polimerazę I oraz czynnik lub czynniki swoistości transkrypcyjnej. Jak do tej pory nie udało się określić dokładnej struktury enzymu jak również nie odnotowano powodzenia w izolacji homogennego czynnika lub czynników transkrypcyjnych. Tym niemniej z całą pewnością ustalono, że oba elementy (enzym + czynnik, -i) są niezbędne i wystarczające do swoistej transkrypcji rDNA. Udokumentowano, że enzym nie rozpoznaje i nie wiąże się bezpośrednio z genem kodującym rRNA właściwość taką natomiast posiada czynnik (-i) transkrypcyjny, który następnie ułatwia wiązanie Pol I.

Do najważniejszych etapów swoistej transkrypcji genów rybosomowych zalicza się: 1. wczesne rozpoznanie i wiązanie się z regionem UPE czynnika nie będącego swoistym gatunkowo (np. SF-1), następnie, 2. wiązanie czynnika swoistego gatunkowo (np. SL-1) z regionem UPE i UCE, dalej, 3. wiązanie enzymu Pol I (etap ten określa się jako powstanie kompleksu preinicjacyjnego), a nstępnie, 4. przeniesienie Pol I do miejsca startu transkrypcji z utworzeniem kompleksu inicjacyjnego, któremu towarzyszy denaturacja krót-

http://rcin.org.pl



Ryc. 3. Schemat organizacji sekwencji regulatorowych rDNA i czynników białkowych w inicjacji syntezy rybosomowego RNA. Objaśnienia skrótów w tekście.

kiego fragmentu genu w obrębie miejsca startu transkrypcji. W obecnej chwili trudno jest jeszcze przedstawić w sposób zwarty i jednoznaczny całość procesu transkrypcji rDNA. Mnogość czynników o różnym nazewnictwie, niedostateczna znajomość formy strukturalnej enzymu Pol I zaangażowanej w swoistą transkrypcję utrudniają zrozumienie opisanego procesu. W tym również celu podczas ostatniego Sympozjum w Cold Spring Harbour poświęconego syntezie rybosomów zorganizowano seminarium, którego celem było ujednolicenie nazewnictwa czynników transkrypcyjnych. Nie uzyskano jednak porozumienia, laboratoria zajmujące się tymi zagadnieniami stosują różne procedury izolowania czynników i enzymu, ponadto do tej pory w żadnym z laboratoriów nie udało się uzyskać homogennego preparatu, trudnym jest zatem porównanie preparatów między sobą. Tym niemniej uzgodniono, że istnieje wielka potrzeba wymiany preparatów Pol I jak również czynników transkrypcyjnych pomiędzy laboratoriami w celu ich porównania. Sądzić należy, że w niedługim czasie zarysuje się pewien porządek w nazewnictwie w rozważanym zagadnieniu.

Artykuł otrzymano 22 czerwca 1989 r.
Zaakceptowano do druku 27 lutego 1990 r.

Piśmiennictwo

1. **Grummt I., (1978),** w *The Cell Nucleus*, red. H. Bush, t. 5, str. 373-412; Academic Press, New York.
2. Mandal R., (1984), *Prog. Nucl. Res. and Mol. Biol.*, **31**, 115-159.
3. Bush H., Rothblum L., red., (1982), *The Cell Nucleus*, t. 10-12; Academic Press, New York.
4. Long E., David I., (1980), *Ann. Rev. Biochem.*, **49**, 727-754.
5. Bush H., Smetana K., (1970), *The Nucleolus;* Academic Press, New York
6. Hadjiolova A. A., (1985), w *The Nucleolus and ribosome biogenesis*; Springer-Verlag, New York.
7. Reeder R. H., (1974), w Rybosomes, red. M. Nomura, str. 489-519; Cold Spring Harbour, NY: Cold Spring Harbour Lab.
8. Petersen R., Sylvester J. E., (1988), w Ribosome Synthesis, str. 134; Cold Spring Harbour, NY: CSH Lab.
9. Bateman E., Paule M., (1988), *Mol. Cell Biol.*, **8**, 1940-1946.
10. Kownin P., Bateman E., Paule M. R., (1987), *Cell*, **50**, 693-699.
11. Kownin P., Iida C. T., Brown-Shimer C., Paule M. R., (1985), *Nucleic Acids Res.*, **13**, 6237-6248.
12. Iida C. T., Kownin P., Paule M. R., (1985), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 1668-1672.
13. Yamamoto O., Takakusa N., Mishima Y., Kominami R., Muramatsu M., (1984), *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, **81**, 299-303.
14. Grummt I., (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 6908-6911.
15. Miller K., Tower J., Sollner-Webb B., (1985), *Mol. Cell Biol.*, **5**, 554-562.
16. Learned R., Smale S., Haltiner M., Tjian R., (1983), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 3558-3562.
17. Kohorn B. D., Rae P. M. M., (1983), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 3265-3269.
18. Kohorn B. D., Rae P. M. M., (1983), *Nature*, **304**, 179-181.
19. Moss T., (1982), *Cell*, **30**, 835-842.
20. Sollner-Web B., Wilkinson J. A., Roan J., Reeder R. H., (1983), *Cell*, **35**, 199-206.
21. Sutiphong J., Matzura C., Niles E. G., (1984), *Biochemistry*, **23**, 6319-6326.
22. Swanson M. E., Yip M., Holland M. J., (1985), *J. Biol. Chem.*, **260**, 9905-9915.
23. Miller K. G., Tower J., Sollner-Webb B., (1985), *Mol. Cell Biol.*, **5**, 554-562.
24. Cassidy B. G., Yang-Yen H. F., Rothblum L. I., (1987), *Mol. Cell Biol.*, **7**, 2388-2396.
25. Bell P. S., Learned R. M., Jantzen M., Tjian R. T., (1988), w *Ribosomes Synthesis*; Cold Spring Harbour, NY: CSH Lab.
26. Skinner J., Ohrlein A., Grummt I., (1984), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 2137-2141.
27. Kishimoto T., Nagamine M., Sasaki T., Takakusa N., Miwa T., Kominami R., Muramatsu M., (1985), *Nucleic Acids Res.*, **113**, 3515-3532.
28. Sollner-Webb B., Tower J., (1986) *Ann. Rev. Biochem.*, **55**, 801-830.
29. Miller K. G., Tower J., Sollner-Webb B., (1985), *Mol. Cell Biol.*, **5**, 554-562.
30. Haltiner M., Smale S., Tjian R., (1986), *Mol. Cell Biol.*, **6**, 227-235.
31. Jones M., Learned R., Tjian R., (1988), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 669-672.
32. Grummt I., Kuhn A., Bartsch I., Rosenbauer H., (1986), *Cell*, **47**, 901-911.
33. McStay B., Reeder R., (1986), *Cell*, **47**, 913-920.
34. Moss T., (1983), *Nature*, **302**, 223-228.
35. de Winter R., Moss T., (1986), *Cell*, **44**, 313-318.
36. Labhart P., Reeder R. H., (1984), *Cell*, **37**, 285-289.
37. Dunaway M., Reeder R. H., (1985), *Mol. Cell Biol.*, **5**, 313-319.
38. Culotta V. C., Sollner-Webb B., (1985), *J. Cell Biochem.*, **B 9**, 156.
39. Sollner-Webb B., Miller K. G., Tower J., Culotta V. C., Windle J., (1985), *J. Cell Biochem.*, **B 9**, 174.
40. Busby S., Reeder R., (1983), *Cell*, **34**, 989-996.
41. Kurl R., Rothblum L., Jacobs S., (1984), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 6672-6675.
42. Reeder R., (1984), *Cell*, **38**, 349-351.
43. Reeder R., Roan J., Dunaway M., (1983), *Cell*, **35**, 449-456.
44. Cassidy B., Yang-Yen H. F., Rothblum L., (1986), *Mol. Cell Biol.*, **6**, 2766-2773.
45. Learned R. M., Cordes S., Tjian R., (1985), *Mol. Cell Biol.*, **5**, 1358-1369.

http://rcin.org.pl

46. Grummt I., Buttgereit D., Clos J., (1985), w Sequence Specificity in Transcription and Translation, red. Alan R. Liss, Inc.
47. Paule M. R., Iida C. T., Perna P. J., Harris G. H., Knoll D. A., D'Alessio J. M., (1984), *Nucleic Acids Res.*, **12**, 8161-8180.
48. Paule M. R., Iida C. T., Perna P. J., Harris G. H., Brown-Shimer S. L., Kownin P., (1984), *Biochemistry*, **23**, 4167-4172.
49. Fried M., Crothers D., (1984), *J. Mol. Biol.*, **172**, 241-262.
50. Hendrickson W., (1985), *Biotechniques*, May/June, 198-207.
51. Wu C., (1985), *Nature*, **317**, 84-87.
52. Tullius T., Dombroski B., (1986), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 5469-5473.
53. Yang-Yen H. F., Rothblum L., (1988), *Mol. Cell Biol.*, **8**, 3406-3414.
54. Liu S. H., Rose K. M., (1986), *J. Biol. Chem.*, **261**, 8520-8527.
55. Reimer G., Rose K. M., Scheer U., Tan E. M., (1987), *J. Clin. Invest.*, **79**, 65-72.
56. Scheer U., Rose K. M., (1984), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **18**, 1431-1435.
57. Scheer U., Lanfrauchi G., Rose K. M., Franke W. W., Ringertz N. R., (1983), *J. Cell Biol.*, **97**, 16141-16143.
58. Scheer U., Hugle B., Hazan R., Rose K. M., (1984), *J. Cell Biol.*, **99**, 672-679.
59. Memet S., Gouy M., Marck C., Sentenac A., Buhler J. M., (1988), *J. Biol. Chem.*, **263**, 2830-2839.
60. Rose K. M., Stetler D. A., Jacob S. T., (1981), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 2833-2837.
61. Rose K. M., Szopa J., Han F. S., Cheng Y. C., Richter A., Scheer U., (1988), *Chromosoma*, **96**, 411-416.
62. Zang H., Wang J. C., Liu L. F., (1988), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 1060-1064.
63. Rose K. M., Arezzo F., Szopa J., (1988), w Ribosomes Synthesis, str. 149; Cold Spring Harbour, NY: CSH Lab.
64. Szopa J., Rose K. M., (1986), *J. Biol. Chem.*, **261**, 9022-9028.
65. Bartholomew B., Dahmus M. M., Meares C. F., (1986), *J. Biol. Chem.*, **261**, 14226-14231.
66. Tower J., Sollner-Webb B., (1987), *Cell*, **50**, 873-883.
67. Bateman E., Paule M. R., (1986), *Cell*, **47**, 445-450.
68. Szopa J., Rose K. M., (1988), w Ribosomes Synthesis, str. 165; Cold Spring Harbour, NY: CSH Lab.
69. Kurl R. N., Jacob S. T., (1984), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 1059-1063.
70. Mishima Y., Financsek I., Kominami R., Muramatsu M., (1982), *Nucleic Acids Res.*, **10**, 6659-6670.
71. Tower J., Culotta V. C., Sollner-Webb B., (185), *J. Cell. Biochem.*, **9**, 206.
72. Bell S. P., Learned M. R., Jantzen M., Tjian R. T., (1988), w Ribosomes Synthesis, str. 103; Cold Spring Harbour, NY: CSH Lab.
73. Grummt I., Clos J., Bartsch I., (1988) w Ribosomes Synthesis, str. 100; Cold Spring Harbour, NY: CSH Lab.
74. Mishima Y., Matsui T., Muramatsu M., (1979), *J. Biochem.*, **85**, 807-818.
75. Grummt I,. Smith V. A., Grummt F., (1976), *Cell*, **7**, 439-445.
76. Benecke B. J., Ferenes A., Seifart K. H., (1973), *FEBS Lett.*, **31**, 53-58.
77. Paule M. R., Bateman E., Hoffman L., Iida C. T., Kownin P., Kubaska W., Risi P., Zwick M:, (1988), w Ribosomes Synthesis, str. 96; Cold Spring Harbour, NY: CSH Lab.
78. Bell S., Learned R., Jantzen H. M., Tjian R., (1988), *Science*, **241**, 1192-1197.
79. Learned R., Learned T., Haltiner M., Tjian R., (1986), *Cell*, **45**, 847-857.
80. Reeder R. H., McStay B., Walker P., Schultz M., Kristensen K., Westegaart O., (1988), w Ribosomes Synthesis, str. 94; Cold Spring Harbour, NY: CSH Lab.
81. Bateman E., Paule M. R., (1988), *Cell*, **54**, 985-992.
82. Moss T., Read C., Firek S., Guimond A., Larose A. M., (1988), w Ribosomes Synthesis, str. 95, Cold Spring Harbour, NY: CSH Lab.

SECOND EUROPEAN SYMPOSIUM ON CALCIUM BINDING PROTEINS IN NORMAL AND TRANSFORMED CELLS.

Marseille, March 1-4, 1992

Organizing Committee
Donato Rosario (Italy)
Haiech Jacques (France)
Heizmann Claus W (Switzerland)
Pochet Roland (Belgium)

To receive the second announcement and abstract forms,
return this section to Dr. J. HAIECH,
31, Chemin J. AIGUIER, BP71
13277, MARSEILLE FRANCE
Phone: (33) 91-22-42-21
Fax: (33) 91-71-89-14

First announcement of the Second European Symposium on Calcium Binding Proteins in Normal and Transformed Cells.

This symposium will be held in Marseille, March 1-4 1992. The session will be held at the CNRS campus, 31, Chemin J. Aiguier, 13009, Marseille. The campus is located in the south of Marseille, near the University of Luminy (Aix-Marseille II). Marseille is located on the border of the Mediterranean sea, only 100 miles from the French Riviera. The Marseillecuisine is well known for its seafood and its bouillabaisse. Provence and Camargue are nearby (about 50 miles).

Lectures will be presented in an auditorium with poster presentations in adjacent rooms. The official languages of the Symposium will be English and French. The number of participants will be limited to 200.

Scientific Programme:
Structural and Functional Aspects of Calcium Binding Proteins in Normal and Pathological States will be covered, including topics such as: calcium binding proteins in cell cycle and differentiation, regulation of cytoskeleton, novel calcium binding proteins in prokaryotes and invertebrates and new technics.

 http://rcin.org.pl

Enzymatyczna amplifikacja *in vitro* specyficznych sekwencji DNA

In vitro enzymatic amplification of specific DNA sequences

MAŁGORZATA JUNGERMAN[1]
RYSZARD SŁOMSKI[2]

Spis treści:

I. Wstęp
II. Techniki rekombinacji DNA w diagnostyce chorób genetycznych
III. Zasada enzymatycznej amplifikacji specyficznych sekwencji DNA
IV. Zastosowania PCR z użyciem fragmentu Klenowa polimerazy DNA I
V. Zastosowania PCR z użyciem polimerazy Tag
VI. Oznaczanie sekwencji nukleotydów amplifikowanych odcinków DNA
VII. Zastosowania PCR w medycynie sądowej
VIII. Uwagi końcowe

Contents:

I. Introduction
II. Recombinant DNA techniques in diagnosis of genetic diseases
III. Principle of enzymatic amplification of specific DNA sequences
IV. Application of PCR with the use of Klenow fragment of DNA polymerase I
V. Application of PCR with the use of Tag polymerase
VI. Nucleotide sequence determination of amplified DNA fragments
VII. Application of PCR to forensic medicine
VIII. Concluding remarks

Wykaz stosowanych skrótów: ASO — ang. *allele specific oligonucleotide* (oligonukleotyd specyficzny dla allelu); PCR — ang. *polymerase chain reaction* (synteza łańcuchowa fragmentów DNA przy użyciu polimerazy i specyficznych primerów)

I. Wstęp

Diagnostyka chorób genetycznych opierała się do niedawna wyłącznie na badaniu lekarskim połączonym z biochemicznymi testami laboratoryjnymi i analizą rodowodów. Nowym podejściem badawczym jest analiza DNA pacjentów i ich rodzin, umożliwiająca znacznie doskonalszą ocenę choroby genetycznej niż poprzednio stosowane metody. Przede wszystkim powstała możliwość diagnostyki danej choroby przed wystąpieniem jej objawów klinicznych, diagnostyki prenatalnej, identyfikacji nosicieli oraz możliwość rozróżnienia wad genetycznych wywołujących podobne efekty fenotypowe. Ogromny postęp w diagnozowaniu wad genetycznych na poziomie molekularnym jaki dokonał się w ciągu ostatnich lat jest bezpośrednią konsekwencją wprowadzenia do badań klinicznych technik rekombinacji DNA.

II. Techniki rekombinacji DNA w diagnostyce chorób genetycznych

Podstawową metodą wykorzystywaną obecnie w diagnostyce chorób genetycznych jest hybrydyzacja badanego DNA z sondami molekularnymi [1] DNA przeznaczony do badania można uzyskać z krwi obwodowej, fibroblastów lub cebulek włosowych. Dla celów diagnostyki prenatalnej DNA izolowany jest z kosmków kosmówki lub fibroblastów płodu zawartych w płynie owodniowym, pobranym metodą amniocentezy. Oczyszczony wysokocząsteczkowy DNA poddawany jest trawieniu endonukleazami restrykcyjnymi, uzyskane fragmenty rozdzielane są metodą elektroforezy w żelach agarozowym, po czym przeprowadza się hybrydyzację z radioaktywnymi sondami molekularnymi. Następuje wówczas identyfikacja fragmentu o sekwencji nukleotydów homologicznej z sekwencją zastosowanej sondy. Fragment ten lokalizowany jest w żelu metodą autoradiografii.

W populacji ludzkiej występuje polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych DNA związany z naturalną zmiennością w obrębie gatunku. Powoduje on, że badana sekwencja nukleotydów może u różnych osób występować we fragmentach restrykcyjnych różniących się wielkością. Na podstawie badań hybrydyzacyjnych można ustalić w danej rodzinie wielkość fragmentów zawierających gen zmutowany oraz prawidłowy, a następnie identyfikować w tej rodzinie osoby zdrowe i chore oraz nosicieli chorób (heterozygoty). Można również, co jest szczególnie ważne, przeprowadzić diagnostykę prenatalną. W badaniach chorób genetycznych spowodowanych występowaniem znanej mutacji punktowej stosuje się hybrydyzację DNA z sondami typu ASO (ang. *allele specific oligonucleotide*) komplementarnymi do prawidłowej

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

http://rcin.org.pl

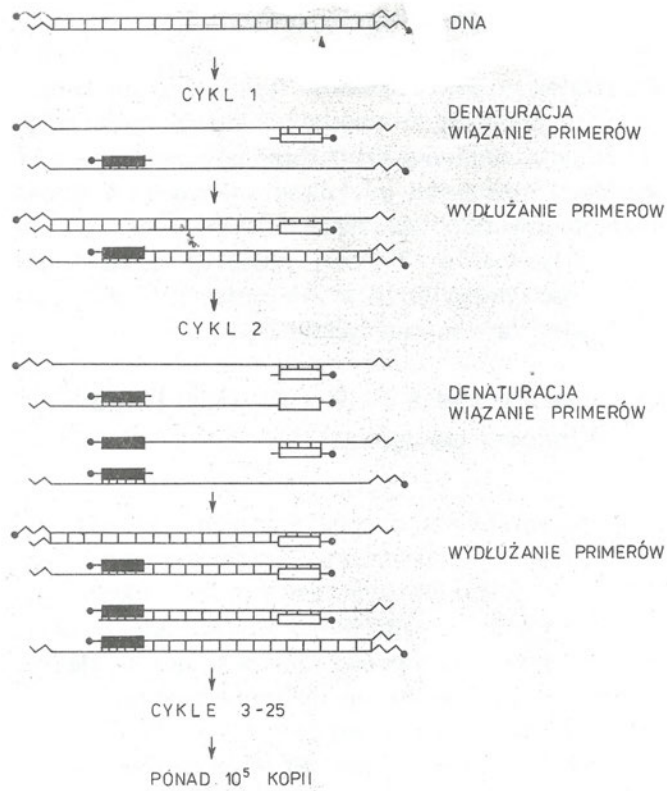
lub zmutowanej sekwencji genu. Warunki doświadczenia dobierane są tak, aby hybrydyzacja występowała tylko w przypadku pełnej homologii sekwencji. Porównanie wyników hybrydyzacji badanego DNA z dwiema sondami pozwala określić, czy badana osoba jest homozygotą (prawidłową lub zmutowaną), czy heterozygotą (nosicielem zmutowanego genu).

Dokładniejsze omówienie wspomnianych metod i ich zastosowania ukazało się już w polskim piśmiennictwie w kilku wcześniejszych publikacjach [2, 3, 4].

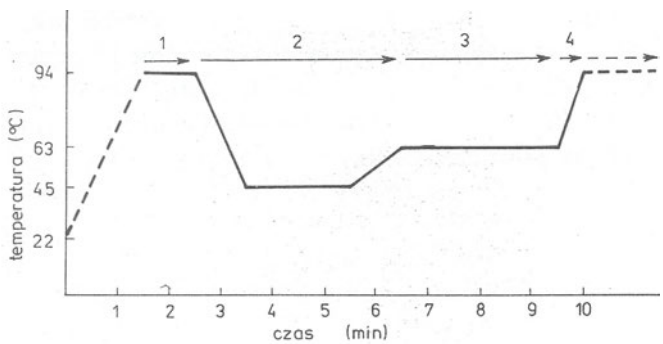
Zastosowanie omawianej metody hybrydyzacji do badań chorób genetycznych spowodowało ogromny postęp w genetyce człowieka, chociaż podstawowym ograniczeniem metody jest konieczność wyizolowania oczyszczonego wysokocząsteczkowego DNA w ilości przynajmniej kilku mikrogramów. Nie stanowi to utrudnienia w przypadku badania osób, gdyż można pobrać od kilku do kilkudziesięciu mililitrów krwi obwodowej, jednak uzyskanie odpowiedniej ilości DNA dla celów diagnostyki prenatalnej jest możliwe tylko przy zastosowaniu hodowli *in vitro* komórek płodu pochodzących z płynu owodniowego. Etap hodowli wydłuża czas konieczny do otrzymania wyniku nawet do kilku tygodni.

III. Zasada enzymatycznej amplifikacji specyficznych sekwencji DNA

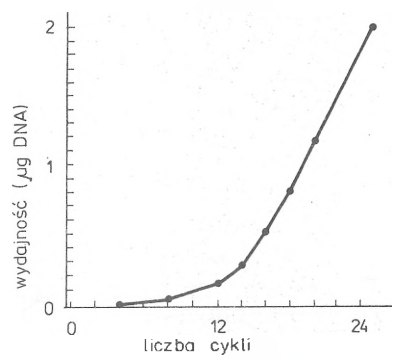
Szereg problemów, jakie stwarzało stosowanie klasycznej hybrydyzacji wg Southerna [1] udało się przezwyciężyć dzięki zastosowaniu metody amplifikacji *in vitro* wybranych sekwencji DNA, opublikowanej w 1985 roku przez Saiki i współautorów [5]. Badanie genotypu przebiega tu w dwóch etapach: pierwszym jest zwielokrotnienie (amplifikacja) wybranej sekwencji genomowego DNA, drugim — analiza uzyskanego w ten sposób materiału metodami hybrydyzacji i sekwencjonowania. Wybrane fragmenty DNA są amplifikowane w wyniku tzw. reakcji PCR (ang. *polymerase chain reaction*), w której stosuje się polimerazę DNA i syntetyczne oligonukleotydy (primery) o wielkości 20-30 nukleotydów, komplementarne do końców wybranej sekwencji DNA, która ma być uzyskana w zwielokrotnionej ilości kopii (Ryc. 1). Jeden z oligonukleotydów jest komplementarny do nici kodującej (+), drugi odpowiednio do nici niekodującej (−). Związanie primera z nicią (+) zdenaturowanego genomowego DNA, po którym następuje jego wydłużanie przez polimerazę DNA z wykorzystaniem trifosforanów dezoksyrybonukleotydów jako substratów, powoduje syntezę nowej nici (−) zawierającej żądaną sekwencję DNA. W tym samym czasie reakcja zachodzi z udziałem drugiego primera, powstaje więc również nowa nić (+). Reakcję prowadzi się cyklicznie — po pierwszej syntezie następuje ponowna denaturacja oraz wiązanie oligonukleotydów z matrycą, przy czym nowo zsyntetyzowane nici są również matrycą do syntezy następnych. W każdym cyklu następuje teore-



Ryc. 1. Zasada PCR (dokładny opis w tekście).



Ryc. 2. Protokół reakcji PCR z zastosowaniem polimerazy Taq.



Ryc. 3. Wydajność syntezy DNA w reakcji PCR.
Schemat przedstawia amplifikację 1 ng genomowego DNA w kolejnych cyklach reakcji. Reakcję przeprowadzono w objętości 100 μl w obecności 2.5 jednostek polimerazy DNA Taq.

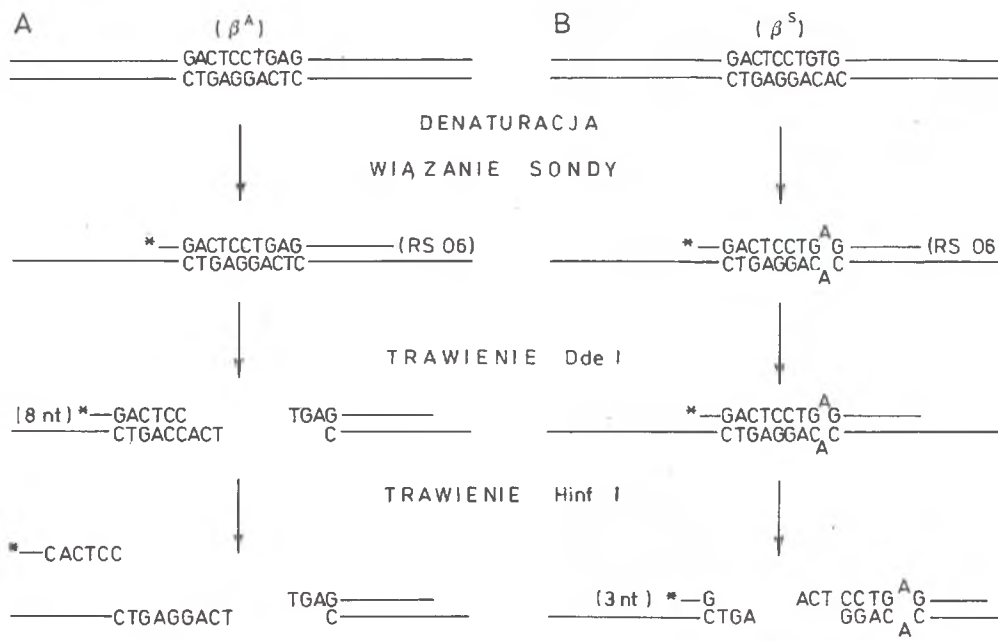
tycznie podwojenie ilości wybranej sekwencji DNA ograniczonej odpowiednio dobranymi primerami W rzeczywistości efektywność syntezy jest nieco niższa, tym niemniej w wyniku 20 do 30 cykli PCR następuje co najmniej 10^5 - krotne powielenie żądanej sekwencji o długości od kilkudziesięciu do kilkuset nukleotydów, odpowiadającej odległości między końcami 5' primerów. Typowy protokół reakcji oraz wydajność syntezy DNA w zależności od liczby cykli PCR przedstawiono na rycinie 2 i 3.

IV. Zastosowania PCR z użyciem fragmentu Klenowa polimerazy DNA I

W początkowym okresie enzymem stosowanym w reakcji był fragment Klenowa polimerazy DNA I z *E. coli*. Enzym ten wykazuje aktywność 5'—>3' polimerazy oraz 3'—>5' egzonukleazy, brak jest natomiast aktywności 5'—>3' egzonukleazy, dzięki czemu nie występuje niebezpieczeństwo degradacji primerów w toku reakcji.

Pionierskie zastosowanie PCR dotyczyło anemii sierpowatej [5]. Amplifikacji poddano 110-nukleotydowy fragment genu β-globiny obejmujący m.in. szósty kodon tego genu, w którym punktowa mutacja, substytucja T—>A wywołuje cechę sierpowatości krwinek czerwonych. Kodon ten leży w obrębie sekwencji rozpoznawanej w prawidłowym genie β^A przez endonukleazę restrykcyjną DdeI, do której bezpośrednio przylega sekwencja rozpoznawana przez enzym HinfI. W genie zmutowanym β^S zmieniona sekwencja nie jest trawiona przez enzym DdeI, a fakt ten wykorzystano w diagnostyce choroby. Uzyskany w wyniku PCR DNA użyto do hybrydyzacji w roztworze z radioaktywną sondą oligonukleotydową RSO6 obejmującą szósty kodon genu β-globiny, po czym przeprowadzono trawienie enzymami DdeI i HinfI. Prawidłowa sekwencja nukleotydów w genie była rozpoznawana i trawiona przez enzym DdeI, przy czym warunki doświadczenia tak dobrano, aby 8-nukleotydowy fragment sondy zawierającej znacznik izotopowy oddysocjowywał od reszty cząsteczki zapobiegając w ten sposób jej trawieniu enzymem HinfI. (Ryc. 4A). Z kolei obecność mutacji powodowała wyłączenie hydrolizy enzymem DdeI i umożliwiała działanie enzymu HinfI. W tym przypadku (Ryc. 4B) po trawieniu oddysocjował znakowany 3-nukleotydowy fragment. Wielkość uwalnianych fragmentów (3 lub 8 nukleotydów) była identyfikowana po elektroforezie w 12% żelu poliakryloamidowym i autoradiografii i świadczyła o występowaniu lub braku mutacji w szóstym kodonie genu β-globiny.

W opisanym powyżej pionierskim doświadczeniu zastosowanie PCR pozwoliło znacznie skrócić czas badań niezbędnych dla postawienia diagnozy. Wystarczającą ilość kopii genu β-globiny uzyskano w ciągu kilku godzin przy użyciu zaledwie 1 μg genomowego DNA, co w przypadku diagnostyki prenatalnej pozwoliło ominąć etap hodowli *in vitro* fibroblastów płodu. Równie ważną zaletą jest możliwość użycia do reakcji preparatu genomowego DNA w znacznym stopniu zdegradowanego w miejsce wysokocząsteczkowego wymaganego w klasycznej analizie hybrydy-



Ryc. 4. Schemat diagnostyki anemii sierpowatej w oparciu o trawienie enzymami DdeI i HinfI. Zaznaczono sekwencję nukleotydów obejmującą szósty kodon genu β-globiny wraz z miejscami rozpoznawanymi przez enzymy DdeI (CTNAG. N — dowolny nukleotyd) i HinfI (GANTC). Pozostałe sekwencje w DNA zaznaczono jako linie ciągłe. RS06 jest sondą oligonukleotydową użytą do hybrydyzacji w roztworze z DNA po amplifikacji. Gwiazdka oznacza położenie radioaktywnego izotopu ^{32}P wprowadzonego na koniec 5' sondy RS06 za pomocą kinazy polinukleotydowej.
A — przebieg trawienia sekwencji prawidłowej
B — przebieg trawienia sekwencji zmutowanej

http://rcin.org.pl

zacyjnej. Degradacja nie może jednak obejmować amplifikowanej sekwencji.

W wyniku kolejnych modyfikacji procedury, wykrywanie mutacji odpowiedzialnej za anemię sierpowatą uległo dalszemu znacznemu uproszczeniu. Eliminacji uległy etapy trawienia endonukleazami restrykcyjnymi i elektroforezy. Posłużono się sondami oligonukleotydowymi typu ASO, które użyto do hybrydyzacji punktowej (ang. *dot-blot hybridization*) z amplifikowanym DNA naniesionym na nitrocelulozę [6]. Zastosowano dwie 19-nukleotydowe sondy: 19A — komplementarną do prawidłowej sekwencji β^A i 19S — komplementarną do zmutowanej sekwencji β^S. Podobnie jak w klasycznej hybrydyzacji punktowej warunki doświadczenia pozwoliły na utworzenie trwałych hybrydów tylko w przypadku pełnej komplementarności sekwencji. DNA homozygot prawidłowych lub zmutowanych hybrydyzował tylko z jedną sondą, natomiast DNA heterozygot (nosicieli zmutowanego genu) z obydwiema sondami, co umożliwiło identyfikację poszczególnych genotypów. Różnica w stosunku do klasycznej hybrydyzacji punktowej polegała na tym, że DNA nakrapiany na nitrocelulozę poddawany jest wcześniej reakcji amplifikacji, co pozwoliło znacznie zmniejszyć ilość wyjściowego genomowego DNA potrzebnego do badań. Doświadczenia z zastosowaniem serii rozcieńczeń genomowego DNA amplifikowanego w 25 cyklach PCR wykazały, że nawet 1 ng DNA stanowi wystarczającą ilość dla uzyskania pozytywnego sygnału w hybrydyzacji punktowej z odpowiednią sondą. Biorąc pod uwagę wielkość haploidalnego genomu ludzkiego wynoszącą $3x10^9$ par zasad, 1 ng DNA jest ilością zawartą w zaledwie 150 diploidalnych komórkach. W innym doświadczeniu genomowy DNA otrzymywano poprzez inkubację zawiesiny komórek pochodzących z hodowli *in vitro* przez kilka minut w temperaturze 95°C. Uzyskane w ten sposób preparaty zawierające silnie zanieczyszczony i zdegradowany genomowy DNA amplifikowano w 25 cyklach PCR, po czym użyto do hybrydyzacji punktowej z sondami ASO. Uzyskiwano pozytywne rezultaty w przypadku nieoczyszczonych lizatów z zaledwie 75 komórek. Zastosowanie PCR pozwoliło więc nie tylko znacznie zmniejszyć wyjściową ilość genomowego DNA potrzebną do analizy, ale także uprościć proces izolacji DNA oraz wykorzystać do badań preparaty DNA złej jakości, silnie zdegradowane i zanieczyszczone materiałem komórkowym.

W podobny sposób badano polimorfizm genowy w obrębie drugiego eksonu *locus* HLA-DQα [6]. W tym przypadku amplifikowane 242-nukleotydowy fragment tego eksonu, który poddano następnie hybrydyzacji punktowej z odpowiednimi sondami oligonukleotydowymi, co umożliwiło identyfikację różnych alleli w obrębie tego *locus*.

W opisanych powyżej doświadczeniach amplifikację DNA prowadzono z użyciem fragmentu Klenowa polimerazy I DNA z *E. coli*. Enzym ten jest termolabilny i wysoka temperatura stosowana przy denaturacji matrycy inaktywuje go. Konieczne jest więc uzupełnienie polimerazy podczas każdego cyklu reakcji. Wymagane jest również stosowanie niskiej (37°C) temperatury wiązania primerów z matrycą, co z kolei obniża znacznie specyficzność tego wiązania. W tych warunkach oligonukleotydy łączą się również z innymi, przypadkowymi sekwencjami o niepełnej komplementarności, czego wynikiem jest amplifikacja fragmentów na matrycy genomowego DNA.

V. Zastosowanie PCR z użyciem polimerazy Taq

Niekorzystne efekty związane ze stosowaniem w reakcji fragmentu Klenowa polimerazy I DNA zostały wyeliminowane w wyniku użycia innego enzymu polimerazy Taq otrzymywanej z termofilnych bakterii *Thermus aquaticus* [7]. Polimerazę Taq cechuje znaczna termostabilność; optymalna temperatura działania wynosi 80°C i temperatura denaturacji matrycy nie pozbawia enzymu aktywności. Nie występuje w związku z tym konieczność dodawania enzymu w każdym kolejnym cyklu amplifikacji, co znacznie upraszcza procedurę PCR. Bardzo ważną korzyścią wynikającą z wprowadzenia polimerazy Taq jest znaczny wzrost specyficzności reakcji. Termostabilność enzymu pozwala na podwyższenie temperatury wiązania oligonukleotydów z matrycą do około 45°C, podczas gdy sama reakcja wydłużania primerów przebiega w 63°C. W tych warunkach primery związane z matrycą w miejscach o niepełnej komplementarności sekwencji oddysocjowują, natomiast wiązania utworzone w miejscach całkowicie komplementarnych są trwałe. Wysoka specyficzność reakcji pociąga za sobą znaczne zwiększenie wydajności syntezy wybranego fragmentu DNA, co w praktyce prowadzi do wystąpienia intensywnego pojedyńczego prążka DNA na żelu [8]. Identyfikacja specyficznego fragmentu DNA syntetyzowanego przez fragment Klenowa polimerazy I DNA wymaga przeprowadzenia po elektroforezie hybrydyzacji wg Southerna z odpowiednią radioaktywną sondą i autoradiografii. Przy zastosowaniu polimerazy Taq wystarczy porównać szybkość migracji elektroforetycznej produktu reakcji i fragmentów DNA o znanej wielkości. Następuje więc dalsze znaczne skrócenie i uproszczenie postępowania oraz co jest szczególnie ważne, wyeliminowana jest konieczność użycia radioaktywnych sond. Kolejną zaletą reakcji z polimerazą Taq jest możliwość syntezy długich (ponad 3000 par zasad) fragmentów DNA, podczas gdy przy pomocy enzymu Klenowa można uzyskać łańcuchy nie dłuższe niż 250 par zasad [8].

Zastosowanie polimerazy Taq pozwoliło też znacznie obniżyć ilość genomowego DNA potrzebnego do badań. We wrześniu 1988 roku opublikowano donie-

 http://rcin.org.pl

sienie o badaniu sekwencji DNA pojedynczej komórki diploidalnej oraz pojedynczego plemnika [9]. Tym samym osiągnięto dolną granicę ilości DNA niezbędnego do oznaczania sekwencji nukleotydów. Badania te dotyczyły genu β-globiny dwóch hodowanych *in vitro* linii komórkowych: homozygot $\beta^A\beta^A$ oraz $\beta^S\beta^S$. Podobnie jak w opisanych wcześniej doświadczeniach amplifikowano odcinek obejmujący szósty kodon genu β-globiny z tą różnicą, że mieszanina reakcyjna zawierała DNA uzyskany drogą lizy pojedyńczej komórki. Po 50 cyklach PCR produkty badano metodą hybrydyzacji punktowej z radioaktywnymi sondami ASO specyficznymi dla sekwencji prawidłowej lub zmutowanej, uzyskując pozytywny wynik z jedną z użytych sond. Analogiczne doświadczenia przeprowadzono z DNA otrzymanym metodą lizy pojedyńczego plemnika. Amplifikowano fragment genu receptora lipoprotein o niskiej gęstości (LDL — ang. *low density lipoprotein*) w DNA pojedynczych plemników heterozygotycznego mężczyzny. Produkty PCR badano metodą hybrydyzacji punktowej z dwiema radioaktywnymi sondami komplementarnymi do poszczególnych alleli. Każda z prób pochodzących z pojedyńczego plemnika hybrydyzowała tylko z jedną sondą. Dowodzi to, że dwa amplifikowane allele segregowały w mejozie zgodnie z prawami M e n d l a i za pomocą PCR amplifikowany był pojedyńczy produkt.

Ostatnio w diagnostyce α-talasemii oraz anemii sierpowatej wykorzystano możliwość nieizotopowego badania produktów PCR z użyciem polimerazy Taq [10]. W badaniach α-talasemii spowodowanej delecją odcinka DNA o długości około 23 tys. par zasad leżącego w obrębie rodziny genów α-globiny amplifikowano część tego odcinka złożoną ze 136 par zasad. Na matrycy DNA osób z prawidłowym genotypem, w przeciwieństwie do osób z delecją, zachodzi w wyniku PCR synteza 136-nukleotydowego fragmentu. W celu wykrycia mutacji powodującej anemię sierpowatą amplifikowano fragment o długości 294 par zasad obejmujący m.in. szósty kodon genu β-globiny. Produkt reakcji poddano działaniu enzymu restrykcyjnego OxaNI. Mutacja odpowiedzialna za anemię sierpowatą zmienia sekwencję rozpoznawaną przez OxaNI, dlatego odcinek amplifikowany na matrycy zmutowanego DNA nie ulega trawieniu. Natomiast produkt PCR syntetyzowany na prawidłowej matrycy jest przecinany na dwa mniejsze fragmenty o długości 191 i 103 par zasad.

Zarówno w przypadku α-talasemii jak i anemii sierpowatej elektroforeza produktów amplifikacji bezpośrednio lub po cięciu enzymem restrykcyjnym wystarcza dla postawienia diagnozy.

Opisane powyżej postępowanie może być zastosowane w diagnostyce prenatalnej. Genomowy DNA płodu potrzebny jako matryca do PCR uzyskuje się metodą lizy komórek płodu pochodzących z biopsji trofoblastu. Nieoczyszczony preparat DNA poddaje się bezpośrednio amplifikacji i opisanym powyżej dalszym etapom badań. Ostateczny wynik można uzyskać w 3 do 4 godzin od chwili pobrania komórek.

Podobne postępowanie wykorzystano w badaniach hemofilii A [11]. Jest to sprzężony z chromosomem X defekt czynnika VIII krzepnięcia krwi, tzw. czynnika przeciwhemofiliowego, którego niedobór w surowicy krwi prowadzi do klasycznej hemofilii. Ponieważ sekwencje polimorficzne w obrębie genu tego czynnika, rozpoznawane przez enzymy BclI [12], BglI [13] oraz XbaI [14] zostały już poznane, badania rodzinne, połączone z analizą rodowodów, pozwoliły powiązać określony wzór trawienia tymi endonukleazami z obecnością prawidłowego bądź zmutowanego allelu. Umożliwiło to diagnostykę prenatalną i identyfikację nosicieli zmutowanego genu w rodzinie, w której mutacja wywołująca tę chorobę była związana z zanikiem miejsca rozpoznawanego przez BclI.

PCR z użyciem polimerazy Taq zastosowano do amplifikacji dwóch odcinków genu (67 i 142 pary zasad) obejmujących odpowiednio miejsca XbaI i BclI. Uzyskane fragmenty DNA poddawano trawieniu tymi enzymami oraz elektroforezie. Obserwacja wielkości fragmentów DNA po PCR i trawieniu pozwoliła zidentyfikować nosicieli zmutowanego genu. W tej samej rodzinie wykorzystano PCR do prenatalnej determinacji płci. W tym przypadku primery stosowane w amplifikacji kierowały syntezą sekwencji o długości około 300 par zasad w obrębie chromosomu Y. Po eletroforezie w żelu obecność lub brak prążka tej wielkości stanowiły dowód na występowanie odpowiednio płci męskiej lub żeńskiej.

VI. Oznaczanie sekwencji nukleotydów amplifikowanych odcinków DNA

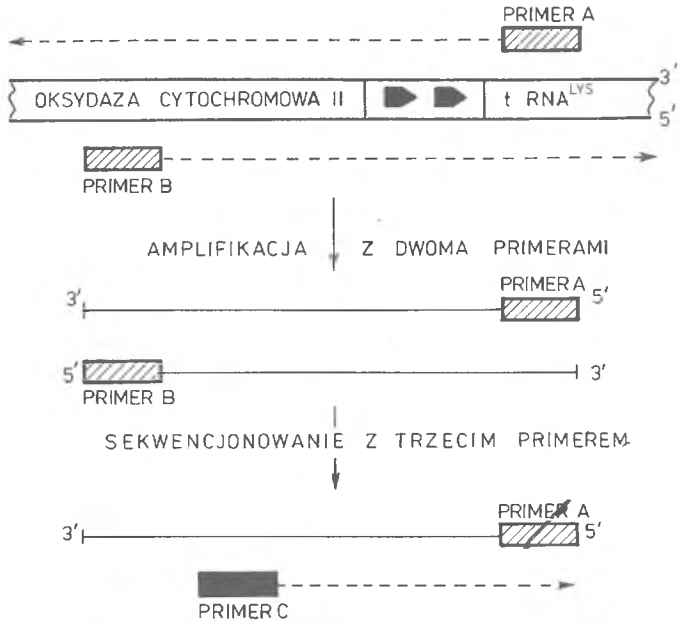
Wysoka specyficzność PCR z użyciem polimerazy Taq umożliwia bezpośrednie poznawanie sekwencji wybranych regionów genomowego DNA. Połączenie PCR i analizy sekwencji produktu amplifikacji może być zastosowane np. do badania genów występujących pojedynczo w haploidalnym genomie i jest szczególnie ważne w studiach nad chorobami genetycznymi wywołanymi nieznaną wcześniej mutacją.

W analizie genomowego DNA pochodzącego od pięciu pacjentow z β-talasemią [15], których zmutowane allele nie były wcześniej scharakteryzowane, połączenie PCR i sekwencjonowania jej produktów pozwoliło wykryć dwie różne nieopisane dotychczas mutacje punktowe odpowiedzialne za powstanie tej choroby. U trzech pozostałych osób dzięki zastosowaniu tej samej metody udowodniono występowanie znanych już wcześniej zmutowanych alleli. W pięciu analizowanych przypadkach amplifikowano i sekwencjonowano fragmenty genu β-globiny o długości 563 i 727 par zasad, a w jednym dodatkowo fragment o długości 336 par zasad zawierający sekwencję promotorową.

http://rcin.org.pl

W prowadzonych wcześniej badaniach sekwencjonowano produkty PCR syntetyzowane przez polimerazę Klenowa [16, 17], jednak wówczas konieczna była wstępna eliminacja produktów niespecyficznych. W badaniach dotyczących genu β-globiny oraz alleli HLA-DQα [16] prowadzono wstępne klonowanie produktów PCR w odpowiednim wektorze, a po wprowadzeniu ich do komórek gospodarza bakteryjnego — selekcja klonów zawierających specyficzne sekwencje DNA. Klony te stanowiły zaledwie 1% wszystkich uzyskiwanych, pozostałe 99% zawierało inne produkty amplifikacji syntetyzowane przez polimerazę Klenowa wskutek niespecyficznego wiązania oligonukleotydów do genomowego DNA. Dopiero po przeprowadzeniu wstępnej selekcji klonów możliwe było sekwencjonowanie specyficznych fragmentów DNA.

Badania ludzkiego mitochondrialnego DNA [17] z zastosowaniem PCR zmierzały do ustalenia sekwencji nukleotydowej niewielkiego regionu niekodującego, charakteryzującego się zmienną długością. W tym przypadku obecność niespecyficznych produktów amplifikacji nie stanowiła przeszkody w sekwencjonowaniu, do którego użyto oligonukleotydu komplementarnego do fragmentu DNA zawartego między primerami kierującymi procesem amplifikacji. Primer sekwencyjny hybrydyzował jedynie ze specyficznym produktem PCR, co jest przedstawione schematycznie na ryc. 5.



Ryc. 5. Metoda sekwencjonowania fragmentu ludzkiego mitochondrialnego DNA. W pierwszym etapie primery A i B kierują amplifikacją wybranej sekwencji DNA. Drugim etapem jest sekwencjonowanie z zastosowaniem oligonukleotydu C komplementarnego do rejonu leżącego pomiędzy A i B (dokładny opis w tekście).

REGULAMIN

Nagrody Polskiego Towarzystwa Biochemicznego na najlepszy wykład z biochemii i biologii molekularnej

1. Intencją Nagrody jest popularyzacja biochemii i biologii molekularnej oraz pozyskanie materiałów dydaktycznych.

2. Warunkiem wzięcia udziału w Konkursie jest przygotowanie wykładu na wybrany temat uwzględniający najnowsze osiągnięcia w tej dziedzinie oraz ilustrujących go materiałów w postaci maszynopisu, rysunków i kompletu przezroczy. Termin nadsyłania materiałów mija 31.04.1991 r.

3. Przewidziana jest Nagroda Główna w wysokości **3 milionów złotych** (w 1991 r.) oraz dwa wyróżnienia. Środki finansowe na Nagrodę zapewnia Zarząd Główny Polskiego Towarzystwa Biochemicznego.

4. Zarząd Główny Polskiego Towarzystwa Biochemicznego zorganizuje sesję, na której zostaną wygłoszone konkursowe wykłady. Maksymalny czas wystąpienia 2 x 45 minut. W 1991 roku sesja odbędzie się na początku czerwca. Nagroda Główna i wyróżnienia zostaną przyznane w dniu Konkursu.

5. Członkowie Zarządu Głównego tworzą Komisję Konkursową. Ocenią oni prezentację, wartość merytoryczną i dydaktyczną wykładów przyznając od 0 do 10 punktów. Komisja obraduje niejawnie, a protokoł z obrad i inne materiały pozostają w dokumentacji Towarzystwa. Nagrodę uzyska osoba, która otrzyma największą liczbę punków. Nazwisko zwycięzcy Konkursu zostanie podane do wiadomości Członków Polskiego Towarzystwa Biochemicznego w „Postępach Biochemii" oraz w „Listach".

6. Materiały konkursowe: maszynopis wykładu, rysunki, przezrocza i programy komputerowe stają się własnością Polskiego Towarzystwa Biochemicznego i będą rozpowszechniane w placówkach naukowych i dydaktycznych jako wykłady autorskie nagrodzonych osób, rekomendowane przez Oddziały Polskiego Towarzystwa Biochemicznego. Wymagana jest pisemna zgoda na przekazanie materiałów na własność Towarzystwa. Towarzystwo zastrzega sobie prawo do zakupu materiałów nienagrodzonych.

7. Niniejsza wersja regulaminu została uchwalona przez Zarząd Główny Polskiego Towarzystwa Biochemicznego w dniu 5 listopada 1990 roku i wchodzi w życie z dniem uchwalenia.

 http://rcin.org.pl

VII. Zastosowania PCR w medycynie sądowej

Ostatnio zastosowano PCR w badaniach z dziedziny kryminalistyki i medycyny sądowej do identyfikacji osób na podstawie analizy DNA [18]. W tych badaniach źródłem DNA są ślady materiału biologicznego, jak pojedyncze włosy lub zaschnięte plamy krwi czy nasienia. Ilość DNA izolowanego z takiego materiału jest z reguły niewystarczająca do przeprowadzenia badań polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych. Ponadto uzyskiwany preparat zawiera na ogół DNA zdegradowany, co również eliminuje możliwość prawidłowej analizy hybrydyzacyjnej. Zastosowanie PCR pozwala analizować nanogramowe ilości genomowego DNA nawet wtedy, gdy jest to preparat, jak już wspomniano złej jakości. Badania przeprowadzono na próbkach DNA izolowanych z pojedynczych świeżo pobranych włosów, a także zgubionych kilka miesięcy wcześniej. Analizowano układ alleli HLA, których wysoka zmienność pozwala na odróżnienie dawców próbek DNA. Stosując polimerazę Taq amplifikowano fragment genu HLA DQ-α o długości 242 par zasad. Produkt amplifikacji poddano następnie hybrydyzacji punktowej z sondami typu ASO komplementarnymi do różnych alleli tego genu. Wyniki uzyskiwane z zastosowaniem amplifikowanych próbek DNA z włosów były zgodne u badanych osób z wynikami prowadzonych równolegle doświadczeń kontrolnych na próbkach DNA izolowanych z ich krwi. Pozytywny rezultat uzyskano określając tą metodą układ HLA w próbce wyizolowanej z pojedynczego włosa, w której ilość DNA nie przekraczała 1 ng. Możliwość analizowania preparatu DNA wyizolowanego z pojedynczego włosa jest niezwykle ważna, gdyż daje gwarancję badania próbki pochodzącej od jednej osoby, nie zanieczyszczonej obcym materiałem biologicznym.

VIII. Uwagi końcowe

Wprowadzenie PCR do badań genetycznych na poziomie molekularnym pozwala w łatwy i szybki sposób realizować różne cele związane z diagnostyką wad genetycznych: 1) badanie chorób wywołanych delecją pewnych sekwencji DNA, jak np. α-talasemia — obserwuje się brak lub obecność fragmentu o określonej wielkości w amplifikowanych próbkach, postępowanie to zastosowano również do determinacji płci płodu; 2) badanie polimorfizmu miejsc rozpoznawanych przez enzymy restrykcyjne poprzez działanie odpowiednimi endonukleazami na produkty amplifikacji DNA — to podejście można zastosować w badaniach chorób związanych z polimorfizmem długości fragmentów restrykcyjnych DNA, badania mogą być stosowane do wykrywania chorób genetycznych; 3) badanie polimorfizmu sekwencji nie związanego ze zmianą miejsc rozpoznawanych przez endonukleazy restrykcyjne metodą hybrydyzacji produktów amplifikacji DNA z sondami typu ASO — stosowane w analizie chorób wywołanych znanymi mutacjami punktowymi, jak np. niedobór α_1-antytrypsyny; 4) bezpośrednia analiza sekwencji amplifikowanych fragmentów DNA.

Główne zalety wynikające z wprowadzenia PCR do badań to: znaczne skrócenie czasu diagnozowania chorób genetycznych, możliwość analizowania śladowych ilości DNA, znaczne obniżenie tła w badaniach hybrydyzacyjnych w stosunku do klasycznych metod, ominięcie konieczności wyizolowania wysokocząsteczkowego DNA oraz związana z tym możliwość wykorzystania zdegradowanego DNA szczególnie ważna w medycynie sądowej. Nie mniej istotna jest możliwość pominięcia pracy z radioaktywnymi izotopami. Zastosowanie PCR do wstępnego namnożenia fragmentu DNA przeznaczonego do sekwencjonowania pozwala ominąć konieczność żmudnego konstruowania i analizy biblioteki całego ludzkiego genomu, przy czym 1 ng DNA wystarcza dla uzyskania pozytywnego wyniku. Wyłoniła się realna możliwość oznaczenia sekwencji nukleotydów specyficznego regionu w genomie płodu w przeciągu bardzo krótkiego czasu. Wreszcie niesłychanie ważna jest możliwość badania genotypu pojedynczej komórki diploidalnej, która czyni realnym np. badanie różnicowania komórek w ontogenezie związanego z przegrupowaniem sekwencji DNA lub innymi zmianami genetycznymi. Z kolei analiza DNA pojedynczego plemnika może być natychmiast zastosowana w medycynie sądowej w badaniach zmierzających do ustalenia ojcostwa oraz identyfikacji przestępców na podstawie oznaczania haplotypów alleli HLA. Do tej pory ustalenie haplotypu danej osoby wymagało równoległego badania bliskich krewnych, nie zawsze możliwego do przeprowadzenia. Analiza alleli HLA pojedynczego plemnika umożliwi jednoznaczne określenie ich haplotypu i pozwoli przez to w sposób znacznie pewniejszy zidentyfikować jego dawcę.

Technika enzymatycznej amplifikacji znajduje obecnie coraz szersze zastosowanie w laboratoriach biochemicznych i medycznych zaangażowanych w analizowanie sekwencji DNA. Jej niepodważalne zalety mogą ją uczynić w najbliższym czasie jednym z podstawowych narzędzi badawczych genetyki molekularnej.

W najbliższym czasie należy oczekiwać dalszych udoskonaleń metody PCR i rozszerzenia zakresu jej stosowania. DNA na potrzeby amplifikacji można wyizolować z utrwalonych i zatopionych w parafinie tkanek. Jest to szczególnie ważne przy pracach z materiałem zakaźnym, np. można wykryć wirusa HIV (wywołującego AIDS) jeszcze przed pojawieniem się przeciwciał przeciwwirusowych w surowicy krwi [19]. Metoda PCR znajduje coraz szersze zastosowanie w dostarczaniu wyjściowego DNA do oznaczania

http://rcin.org.pl

sekwencji nukleotydów metodą Sangera lub Maxama i Gilberta. Wykorzystuje się też metodę PCR do wbudowywania modyfikowanych nukleotydów do DNA [20]. Wprowadzanie modyfikowanych nukleotydów ma w przyszłości umożliwić kolorymetryczne uwidocznienie amplifikowanych fragmentów DNA.

Artykuł otrzymano 3 stycznia 1989 r.
Zaakceptowano do druku 2 listopada 1989 r.

Piśmiennictwo

1. Southern E. M. (1985), *J. Mol. Biol.* **98,** 503–517.
2. Jungerman M, Słomski R. (1987), *Kosmos,* **36,** 201–212.
3. Ziętkiewicz E., Latos-Bieleńska A. M., Słomski R., (1985), *Pol. Arch. Med. Wewn.,* **74,** 269–278.
4. Słomski R., Ziętkiewicz E., (1987), *Postępy Biochemii,* **33,** 451–472.
5. Saiki R. K., Scharf S., Falcona F., Mullis K. B., Horn G. T., Erlich H. A., Arnheim N., (1985), *Science,* **230,** 1350–1354.
6. Saiki R. K., Bugwan T. L., Horn G. T., Mullis K. B., Erlich H. A., (1986), *Nature,* **324,** 163–166.
7. Chien A., Edgar D. B., Trela J. M., (1976), *J. Bacteriol.,* **127,** 1550–1557.
8. Saiki R. K., Gelfand D. H., Stoffel S., Scharf S. J., Higuchi R., Horn G. T., Mullis K., Erlich H. A., (1988), *Science,* **239,** 487–491.
9. Honghua L., Gyllensten U. B., Cui X., Saiki R. K., Erlich H. A., Arnheim N., (1988), *Nature,* **335,** 414–417.
10. Chehab F. F., Doherty M., Cai S., Kan Y. W., Cooper S., Rubin E. M., (1987), *Nature,* **329,** 293–294.
11. Kogan S. C., Doherty M., Gitschier J., (1987), *N. Engl. J. Med.* **317,** 985–990.
12. Gitschier J., Drayna D., Tuddenham E. G. G., White R. L., Lawn R. M., (1985), *Nature,* **314,** 738–740.
13. Antonarkis S. E., Waber P. G., Kittur S. D., (1985), *N. Engl. J. Med.,* **313,** 842–848.
14. Wion K. I., Tuddenham E. G. D., Lawn R. M., (1986), *Nucleic Acids. Res.,* **14,** 5435–5442.
15. Wong C., Dowling C. E., Saiki R. K., Higuchi R. G., Erlich H. A., Kazazian Jr. H. H., (1987), *Nature,* **330,** 384–386.
16. Scharf S. J., Horn G. T., Erlich H. A., (1986), *Science,* **233,** 1976–1980.
17. Wrischink L. A., Higuchi R. G., Stonkinag M., Erlich H. A., Arnheim N., Wilson A. C., (1987), *Nucleic Acids Res.,* **15,** 529–542.
18. Higuchi R., von Beroldingen C. H., Sensabaugh G. G., Erlich H. A., (1988), *Nature,* **332,** 543–546.
19. Lai-Goldman M., Lai E., Grody W. W., (1988) *Nucleic Acid Res.,* **16,** 8191.
20. Nakamaye K. L., Gish G., Ekstein F., Vosbary H. P., (1988), *Nucleic Acid Res.,* **16,** 9947,

Nowoczesne metody sekwencjonowania DNA

Modern methods of DNA sequencing

JAN WRZESIŃSKI[1]
WŁODZIMIERZ KRZYŻOSIAK[2]

Spis treści

I. Wstęp
II. Metoda chemiczna
III. Metoda enzymatyczna
IV. Sekwencjonowanie w systemie bakteriofaga M13
V. Sekwencjonowanie dwuniciowych fragmentów DNA
VI. Ulepszenia techniczne metody Sangera
VII. Sekwencjonowanie genomowe i inne metody
VIII. Sekwencjonowanie krótkich oligonukleotydów
IX. Automatyzacja sekwencjonowania DNA

Contents:

I. Introduction
II. Chemical method
III. Enzymatic method
IV. Sequencing in M13 bacteriophage
V. Sequencing of double—stranded DNA fragments
VI. Technical improvements of Sanger method
VII. Genomic sequencing and other methods
VIII. Sequencing of short oligonucleotides
IX. Automation of DNA sequencing

Wykaz stosowanych skrótów: dNTP — trójfosforan dezoksynukleozydu, ddNTP — trójfosforan dwudezoksynukleozydu, dITP — trójfosforan dezoksyinozyny, dc[7] GTP — trójfosforan 7-deazaguanozyny, pz—par zasad, kpz—tysięcy par zasad, DMS—siarczan dwumetylu, DEPC — pirowęglan dwuetylu, DE, CCS celulozy — podłoża jonowymienne NBD—7X—4 nitrobenzo-2-okso-1, 3-diazol

[1] mgr, [2] doc. dr hab., Instytut Chemii Bioorganicznej PAN 61-704 Poznań, ul. Noskowskiego 12/14

I. Wstęp

W latach pięćdziesiątych przedstawiono model budowy przestrzennej cząsteczki DNA, a w toku dalszych badań ustalono przebieg procesów replikacji, transkrypcji i translacji oraz uzyskano wiele informacji o strukturze i organizacji genów.

Szybki postęp tych badań jaki nastąpił w ostatnim dziesięcioleciu stał się możliwy dzięki opracowaniu metod klonowania i sekwencjonowania DNA. Metody klonowania rozwiązały sprawę dostępności odpowiedniej ilości materiału do badań. Natomiast opracowanie szybkich metod sekwencjonowania dało biologii molekularnej podstawowe narzędzie precyzyjnej analizy struktury DNA. Chociaż podstawy metod sekwencjonowania opracowano ponad 10 lat temu ciągle pojawiają się ich udoskonalenia i modyfikacje, dyskutowane w opracowaniach przeglądowych [1–3].

Celem tego artykułu jest przedstawienie aktualnego stanu rozwoju tych metod ze szczególnym

 http://rcin.org.pl

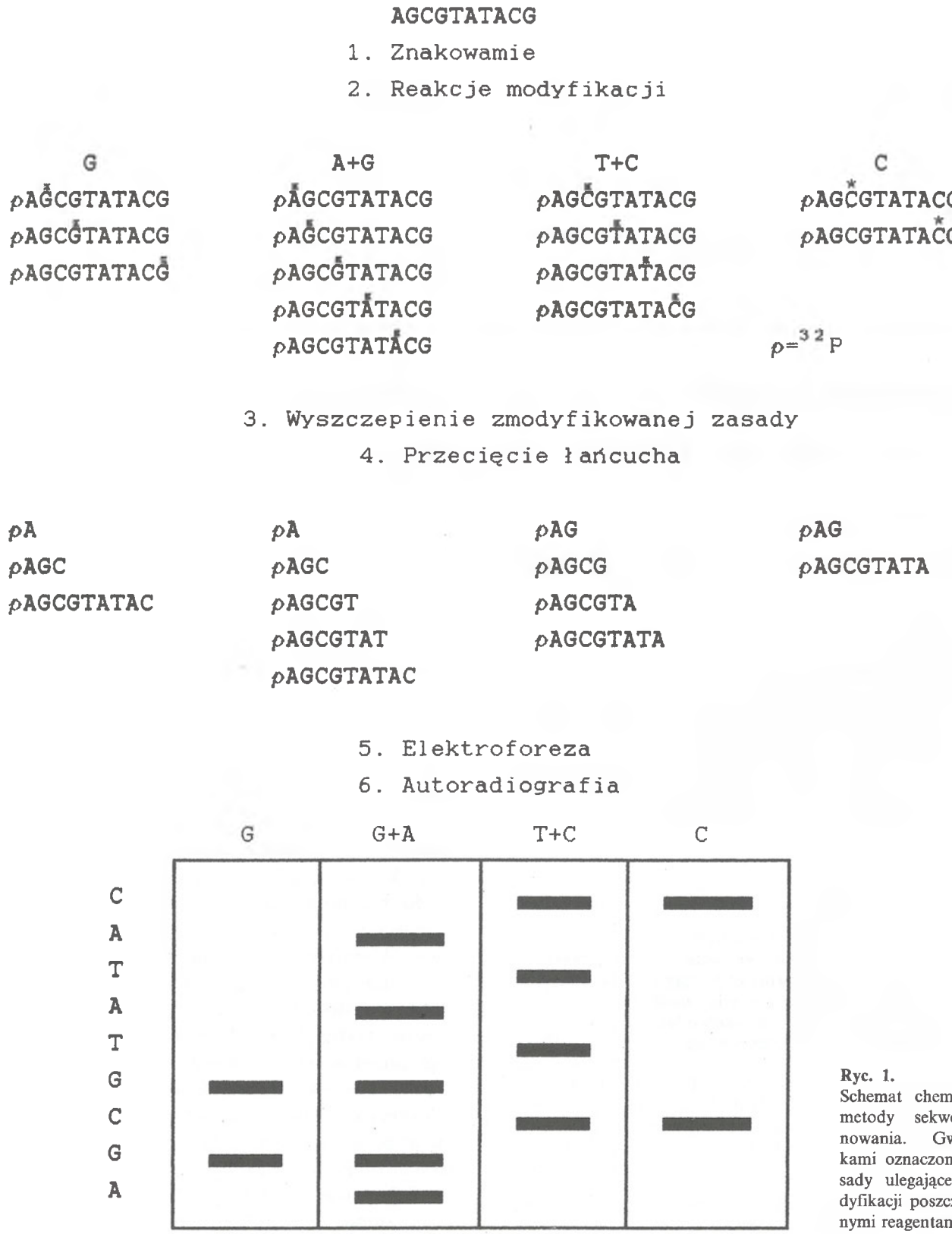
uwzględnieniem najnowszych tendencji obejmujących automatyzację procesu sekwencjonowania DNA.

II. Metoda chemiczna

Chemiczna metoda sekwencjonowania zwana także metodą Maxama–Gilberta wykorzystuje specyficzne reakcje poszczególnych zasad prowadzące do przerwania łańcucha DNA w miejscach chemicznej modyfikacji. Procedura metody obejmuje kilka etapów:

1. Statystyczną modyfikację DNA w warunkach, w których nie więcej niż jedna zasada w cząsteczce DNA ulega modyfikacji,
2. Usunięcie zmodyfikowanej zasady,
3. Przerwanie łańcucha fosforanowo-cukrowego.

Dzięki umieszczeniu radioaktywnego znacznika na końcu 5' lub 3' fragmentu DNA, po elektroforezie na żelu poliakryloamidowym, autoradiografia uwidacz-



Ryc. 1. Schemat chemicznej metody sekwencjonowania. Gwiazdkami oznaczono zasady ulegające modyfikacji poszczególnymi reagentami.

http://rcin.org.pl

nia położenie fragmentów na żelu. Analiza poszczególnych linii na autoradiogramie (każda linia po reakcji z innym odczynnikiem) umożliwia odczytanie sekwencji nukleotydów w badanym fragmencie DNA.

Do znakowania fragmentu DNA stosuje się najczęściej jedną z metod przedstawionych poniżej:

1. Jednoniciowy DNA znakowany jest na końcu 5' za pomocą (γ–^{32}P) ATP i kinazy polinukleotydowej faga T_4 [4–6]. Znakowanie poprzedzone jest hydrolizą grupy fosforanowej obecnej na końcu 5' fragmentu DNA z użyciem alkalicznej fosfatazy [4–6]. Do znakowania końca 3' wykorzystuje się (α–^{32}P) NTP i terminalną transferazę [5–7].

2. Dwuniciowy fragment DNA uzyskany przez sonifikację [8], bądź działaniem DNazy I w obecności jonów Mn^{2+} [9] lub działaniem jonów metali [10, 11], a najczęściej za pomocą enzymów restrykcyjnych [12] znakowany jest w identyczny sposób jak opisano powyżej. Procedura taka wprowadza jednak znacznik promieniotwórczy na obydwa końce 5' lub 3' dwuniciowego DNA. Fragment DNA znakowany na jednym końcu uzyskuje się przez rozdział elektroforetyczny obydwu nici w warunkach denaturujących [13], bądź przez hydrolizę odpowiednio dobranym enzymem restrykcyjnym w wyniku której powstają dwa asymetryczne (o różnej długości) fragmenty DNA [6].

3. Jeżeli do otrzymania fragmentu DNA zastosowano trawienie enzymami restrykcyjnymi pozostawiającymi lepkie końce to alternatywnym sposobem znakowania końca 3' obydwu nici jest użycie fragmentu Klenowa polimerazy I DNA z *E. coli* i (α–^{32}P) NTP [5, 6, 14].

Opisane metody otrzymywania fragmentów DNA znakowanych na jednym z końców są dość pracochłonne. Dla ich uproszczenia zastosowano znakowanie klonowanego DNA bezpośrednio w wektorach plazmidowych. Ruther i współautorzy [15] skonstruowali wektor plazmidowy pUR 222, który posiada odpowiednie miejsca klonowania i część operonu laktozy przeniesione z wektora M13mp7 [16]. Wklonowanie operonu laktozy pozwoliło na szybką selekcję klonów zawierających badany insert DNA. Zrekombinowany plazmid przecinano enzymem restrykcyjnym i znakowano wolny koniec 3' insertu DNA stosując metodę 3. Fragment zawierający piętno izotopowe uwalniano następnie z plazmidu i poddawano sekwecjonowaniu. Opisano również wektor pCSV 31 [17] posiadający *polilinker** z miejscem restrykcyjnym dla Sma I (gdzie wstawiano badany insert DNA) otoczony z obydwu stron dwoma różnymi sekwencjami rozpoznawanymi przez Tth 111 I, które wykorzystano do znakowania jednej nici DNA.

Enzym restrykcyjny Tth 111 I rozpoznaje sekwencję 5' GACTNAGTC 3' (N = A, G, T, C). Po hydrolizie, na końcach 5' nici DNA pozostaje niesparowany nukleotyd N, na każdym końcu inny. Stosując do znakowania fragment Klenowa polimerazy I DNA z *E. coli* oraz komplementarny (α–^{32}P)dNTP [5, 6, 14] (metoda 3) można selektywnie wprowadzić znacznik radioaktywny na jedną bądź drugą nić DNA. Wadą tego plazmidu jest, że może on występować w komórkach gospodarza w stosunkowo niewielkiej ilości kopii. Później skonstruowane wektory pSP64CS i pSP65CS posiadają właściwości wektora pCSV 31, ale mają bardziej uniwersalne zastosowanie [18], występują bowiem w znacznie większej liczbie kopii i zaopatrzone są w promotory dla polimerazy RNA faga SP6, co pozwala również na ich użycie jako wektorów transkrypcyjnych.

Po znakowaniu, kolejnym etapem w procedurze sekwencjonowania jest chemiczna modyfikacja odczynnikami wykazującymi zróżnicowaną reaktywność w stosunku do poszczególnych zasad występujących w DNA.

Zestawienie najczęściej stosowanych do modyfikacji zasad odczynników chemicznych zawiera tabela 1.

Tabela 1

Odczynniki stosowane w metodzie chemicznej sekwencjonowania DNA oraz ich specyficzność.

Lp	Odczynniki	Specyf.	Piśm.
1	DMS pH 8,0	G > A	4,13
2	DMS pH 3,5	A	4,13
3	Hydrazyna	C + T	4,13
4	Hydrazyna + 1,5 M NaCl	C	4,13
5	DEPC pH 5,0	A + G	19
6	DEPC pH 8,0	G > C	19
7	utlenianie w obecności błękitu metylenowego	G	20
8	OsO_4	T	20
9	fotoliza w obecności amin	T > C	21
10	fotoliza w obecności spermidyny	T	22
11	66% HCOOH	A + G	23, 24
12	$KMnO_4$	T > Pu	25
13	NH_2OH pH 6,0	C	25
14	H_2O_2	T + C	26
		A + G	23

Stosowana obecnie szeroko kombinacja reagentów obejmuje DMS w środowisku alkalicznym (reaguje G), HCOOH (reagują A + G), hydrazynę (reagują T + C), hydrazynę w obecności 1,5 M soli (reaguje C). Modyfikacja zasady osłabia wiązanie glikozydowe i w dalszych etapach dochodzi do usunięcia zasady z łańcucha fosforanowo-cukrowego, a następnie, w reakcji z piperydyną zachodzi przerwanie łańcucha DNA według mechanizmu ß – eliminacji [27].

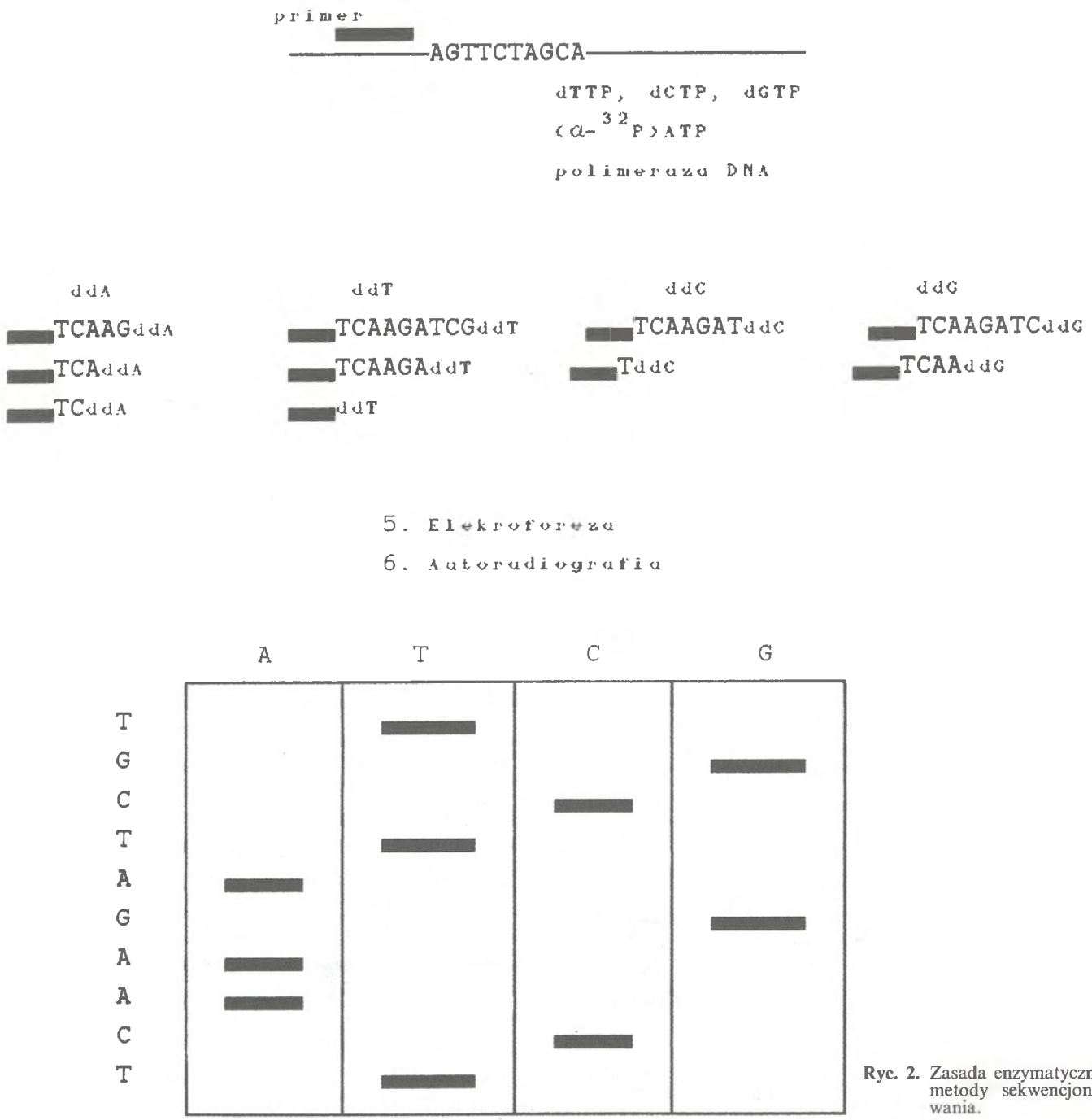
Najpoważniejszą wadą metody Maxama–Gilberta jest jej pracochłonność i czasochłonność, gdyż obok znakowania i reakcji chemicznych procedura obejmuje szereg precypitacji i liofilizacji. Celem ich ominięcia i uatrakcyjnienia metody wprowadzano szereg modyfikacji. Jedną z nich było prowadzenie sekwencjonowania na podłożu stałym, celulozie DE 81 [28], i celulozie CCS [23]. Celuloza DE 81 nie znalazła szerszego

* — krótki syntetyczny fragment DNA posiadający sekwencję rozpoznawaną przez szereg enzymów restrykcyjnych.

 http://rcin.org.pl

zastosowania z powodu niskiej odporności mechanicznej. Wady tej nie posiadało jonowymienne podłoże syntetyzowane przez grupę Rosenthala [23]. W reakcjach modyfikacji fragmentu DNA o długości 0,5–5 kpz unieruchomionego na CCS–celulozie najlepsze rezultaty uzyskano stosując DMS, HCOOH, $KMnO_4$ i NH_2OH. Inną modyfikacją procedury sekwencjonowania wg Maxama–Gilberta było zastosowanie chromatografii w fazie odwróconej na kolumnie C_{18} Sep–Pac [29], do usuwania nadmiaru reagentów po reakcji modyfikacji i piperydyny po reakcji rozerwania łańcucha. To techniczne usprawnienie może znaleźć w przyszłości zastosowanie do automatyzacji procesu sekwencjonowania DNA. Przeprowadzono także próby zastosowania do sekwencjonowania wyłącznie piperydyny. Stosowano jej 0,5 M roztwór oraz ten sam roztwór z dodatkiem 0,3 M NaCl [30, 31]. Sekwencję nukleotydów odczytywano analizując szybkość migracji poszczególnych fragmentów jak i odpowiadające im intensywności pasm na autoradiogramie. Metodę tę, stanowiącą daleko idące uproszczenie standardowej procedury można stosować, jak zastrzegają sami autorzy, do potwierdzania znanych sekwencji czy identyfikacji mutantów. Stosowanie jej do określania nieznanych sekwencji byłoby obarczone zbyt dużym błędem.

Istotnymi zaletami metody chemicznej są stosunkowo niski procent błędu – rzędu 1%, – osiągany przy sekwencjonowaniu jednej nici oraz nieznaczny wpływ struktury drugorzędowej na czytelność autoradiogramów.



Ryc. 2. Zasada enzymatycznej metody sekwencjonowania.

http://rcin.org.pl

III. Metoda enzymatyczna

W enzymatycznej metodzie sekwencjonowania zwanej inaczej metodą Sangera lub dideoxy, wykorzystuje się kontrolowaną syntezę drugiej nici DNA [32, 33]. Po hybrydyzacji primera (komplementarnego oligonukleotydu) do jednoniciowej matrycy synteza drugiej nici przez polimerazę DNA ulega terminacji w miejscach wprowadzenia dwudezoksynukleotydów. W ten sposób otrzymuje się szereg fragmentów różnej długości zakończonych na końcu 3' odpowiednim terminatorem. Elektroforeza na żelu poliakryloamidowym pozwala na ich rozdzielenie, a wbudowanie radioaktywnego znacznika najczęściej (α–^{32}P)dATP do łańcucha podczas jego syntezy oraz autoradiografia uwidaczniają położenie fragmentów DNA na żelu. Przy zastosowaniu 4 różnych terminatorów w oddzielnych reakcjach można odczytać sekwencję nici DNA komplementarnej do matrycy.

Jako primery stosuje się zazwyczaj syntetyczne oligonukleotydy [34, 35] lub znacznie rzadziej fragmenty restrykcyjne [32]. Najczęściej stosowaną polimerazą jest fragment Klenowa polimerazy I DNA z *Escherichia coli*. Jest to większa podjednostka tej polimerazy pozbawiona aktywności 5' – 3' egzonukleazowej [36].

Kluczowym problemem przy stosowaniu metody enzymatycznej Sangera jest właściwy stosunek molowy dezoksy i dwudezoksynukleotydów. Zbyt wysoki udział terminatorów w mieszaninie reakcyjnej prowadzi do zahamowania syntezy na poziomie krótkich fragmentów, a zbyt niski do dużego udziału fragmentów długich. Przy dobieraniu stosunku dNTP/ddNTP należy także brać pod uwagę czynnik związany z wbudowaniem radioaktywnego znacznika w łańcuch DNA w trakcie syntezy drugiej nici, gdyż ze wzrostem długości rośnie ilość zawartej w nim radioaktywności. Aby zapewnić równą dystrybucję radioaktywności we fragmentach, ich frakcje molowe muszą maleć wraz z długością lub należy zastosować znakowany primer [37]. Metoda enzymatyczna dzięki swej prostocie jest obecnie znacznie częściej stosowana i zostanie szerzej przedstawiona w dalszej części artykułu.

IV. Sekwencjonowanie w systemie bakteriofaga M13

Metoda enzymatyczna Sangera do niedawna wymagała stosowania wyłącznie jednoniciowej matrycy (porównaj rozdział V). Otrzymywano ją przez zastosowanie do klonowania jednoniciowych bakteriofagów M13. Informacje dotyczące sekwencjonowania z zastosowaniem faga M13 i jego pochodnych przedstawione zostaną skrótowo, gdyż w Postępach Biochemii ukazał się ostatnio artykuł przeglądowy poświęcony temu zagadnieniu [38].

Bakteriofag M13 jest fagiem DNA o genomie wielkości 6407 nukleotydów [39], namnażającym się w komórkach *E. coli*. Należy do grupy fagów Ff, a jego cykl życiowy jest dobrze poznany [40–42]. Ponieważ fag M13 nie posiada markerów umożliwiających łatwą selekcję rekombinantów, został zmodyfikowany poprzez wstawienie do jego genomu części genu β–galaktozydazy. W ten sposób powstał wektor M13mp [43]. Dalsza modyfikacja tego wektora polegała na wstawieniu do genu β–galaktozydazy polilinera wielkości 42–57 nukleotydów posiadającego unikatowe miejsca restrykcyjne. Powstała w ten sposób cała seria wektorów M13mp różniących się ilością miejsc restrykcyjnych w polilinkerze i jego orientacją [16, 44–49]. Metoda sekwencjonowania w bakteriofagu M13 jest obecnie najczęściej stosowana. Wiąże się to z łatwością otrzymywania formy dwuniciowej, replikatywnej, wykorzystywanej do klonowania insertów badanego DNA oraz formy jednoniciowej służącej jako matryca do sekwencjonowania, gdyż sekrecja dojrzałych jednoniciowych fagów następuje bezpośrednio do pożywki hodowlanej. Wadą tej metody jest często stwierdzane samorzutne usuwanie większych insertów DNA ($>$3 kpz) [42, 50, 51], które nie zachodzi przy stosowaniu wektorów hybrydowych fagemidów posiadających zarówno właściwości plazmidów jak i fagów. Skonstruowano je przez przeniesienie do plazmidów rodziny pBR oraz pUC fragmentu DNA zawierającego miejsce inicjacji replikacji i morfogenezy (ori) wirusa M13 [51–56]. Zakażenie komórki bakterii zawierającej fagemid fagiem wspomagającym (helper phage) prowadzi do upakowania jednoniciowego DNA do otoczki i jego sekrecji do pożywki. Wykorzystując hybrydowe właściwości plazmidu i wirusa w fagemidach można klonować większe fragmenty DNA, tworzyć biblioteki genowe oraz otrzymywać jednoniciowy DNA do sekwencjonowania.

V. Sekwencjonowanie dwuniciowych fragmentów DNA

Zastosowanie faga M13 do sekwencjonowania metodą enzymatyczną znacznie upraszcza i przyśpiesza proces określania sekwencji DNA. Wiąże się ono jednak z pewną niedogodnością jaką jest konieczność przenoszenia insertu DNA z plazmidu do wektora serii M13mp celem sekwencjonowania. Niedogodność tę ominięto poprzez bezpośrednie użycie do sekwencjonowania dwuniciowego plazmidowego DNA. W celu umożliwienia hybrydyzacji primera do matrycy zastosowano denaturację termiczną [57–63] lub alkaliczną [64–67] plazmidowego DNA. Jako polimerazy stosowano najczęściej: fragment Klenowa polimerazy I DNA z *E. coli* [57–62, 64], odwrotną transkryptazę [63, 65, 66] oraz modyfikowaną T7 DNA polimerazę [67] („sekwenazę"), przy czym najlepsze rezultaty uzyskiwano przy zastosowaniu dwóch ostatnich poli-

 http://rcin.org.pl

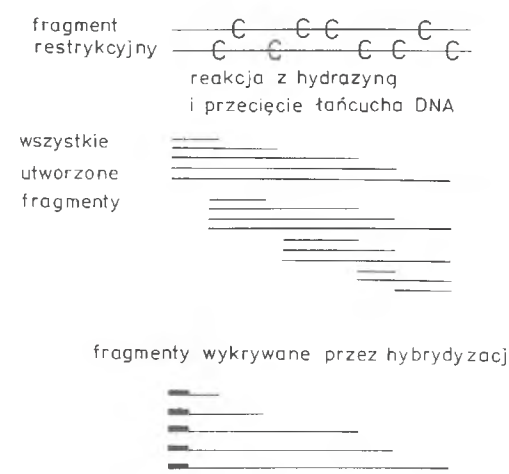
meraz [63, 65, 67]. Poprawę jakości rezultatów uzyskano także przez podwyższenie temperatury reakcji polimeryzacji, użycie oczyszczonej matrycy oraz użycie (α–^{35}S) dATP zamiast (α–^{32}P) dATP [66]. Metoda ta jest coraz częściej stosowana gdyż jest szybka, prosta i powtarzalna. Ponadto bez konieczności dodatkowego klonowania istnieje możliwość sekwencjonowania obydwu nici, co ma istotne znaczenie w przypadku stwierdzenia pewnych niejasności w sekwencji jednej z nich.

VI. Ulepszenia techniczne metody Sangera

Poprawne określenie sekwencji metodą enzymatyczną utrudnia pojawienie się „zatrzymań" syntezy i „kompresji" pasm. Zatrzymania są związane z obecnością dużej ilości par G–C w zwartych strukturach DNA. Polimeraza nie syntetyzuje w tym rejonie komplementarnej nici DNA. Natomiast kompresje powstają w miejscu tworzenia się struktur drugorzędowych jednoniciowego DNA, tak trwałych, że nie niszczą ich denaturujące warunki elektroforezy. Obydwie trudności mogą być przyczyną błędnego odczytywania sekwencji. Problem zatrzymań usiłowano rozwiązać stosując różne polimerazy: 1. fragment Klenowa polimerazy I z *E. coli* [68, 69] 2. odwrotną transkryptazę [70–73] 3. sekwenazę [74] 4. fragment polimerazy z *Basillus stearothermophilus* [75) 5. fagowe polimerazy RNA [76–79]. Problem kompresji pasm na żelu rozwiązywano przez zastosowanie w sekwencjonowaniu dITP [80, 81] oraz dc^{7}GTP [82] w miejsce dGTP. Obydwa analogi nukleotydów tworzą z cytydyną wiązania wodorowe znacznie słabsze od pary G–C [80–82]. Innym proponowanym rozwiązaniem jest podwyższenie właściwości denaturujących żelu poliakryloamidowego przez dodatek formamidu [84] lub prowadzenie elektroforezy w wyższej temperaturze [85]. Wiele usprawnień technicznych zmierza w kierunku zwiększenia ilości informacji uzyskiwanych z pojedyńczego eksperymentu. można to osiągnąć np. przez zastosowanie izotopu siarki ^{35}Sdo znakowania DNA. [86–90]. Izotop ^{35}Semituje słabo energetyczne promieniowanie β przez co praca z nim jest bezpieczniejsza niż w przypadku stosowania izotopu ^{32}P, a znaczne obniżenie szybkości radiolizy wiązań fosfodiestrowych sprawia, że identyczny rozkład fragmentów DNA uzyskuje się z świeżo przygotowanych i kilkutygodniowych mieszanin poreakcyjnych. Ponadto, prążki na autoradiogramie są bardziej ostre przez co można odczytać większą ilość informacji — ok. 600 nukleotydów. Niedogodnością związaną ze stosowaniem izotopu ^{35}Sjest konieczność usuwania mocznika z żelu oraz suszenie żelu przed autoradiografią. W celu zwiększenia rozdzielczości elektroforezy stosowano cienkie żele poliakryloamidowe [85, 91, 92], termostatowane aparaty do elektroforezy [85, 89, 93], gradient buforu elektroforetycznego [86], gradient pola elektrycznego [94, 95] lub metodę transferu fragmentów DNA z żelu po rozdziale na poruszającą się membranę [96].

VII. Sekwencjonowanie genomowe i inne metody

Cechą charakterystyczną eukariotycznego DNA jest duża zawartość metylowanych zasad. U kręgowców 12% a w roślinach 50% cytydyn występuje w postaci 5–metylocytydyny, głównie w sekwencjach G–C [97]. Miejsca metylacji w genomowym DNA określano stosując hydrolizę enzymami restrykcyjnymi, wrażliwymi na metylację zasady w sekwencji rozpoznawanej np. Hpa II, Msp I, Sal I, Xho I [97, 98] lub metodę sekwencjonowania genomowego [99]. Ponieważ zastosowanie enzymów restrykcyjnych jest ograniczone koniecznością występowania metylacji w sekwencji rozpoznawanej, dlatego metoda sekwencjonowania genomowego jest powszechniej stosowana. W celu określenia sekwencji oraz miejsc metylacji wybrany fragment DNA poddawany jest reakcji z hydrazyną oraz pozostałymi odczynnikami używanymi do sekwencjonowania metodą chemiczną. Hydrazyna nie reaguje z 5–metylocytydyną natomiast reaguje z cytydyną i tymidyną [4]. Po reakcji fragmenty DNA rozdzielane są na żelu poliakryloamidowym i przenoszone na nylonową membranę, a DNA wiązany jest do podłoża światłem UV lub termicznie [99, 100]. Badany fragment wykrywany jest poprzez hybrydyzację krótkiego jednoniciowego odcinka DNA lub RNA do DNA unieruchomionego na podłożu. Znakowany radioaktywnie primer jest komplementarny do końca 5' lub 3' badanego DNA. W ten sposób tylko hybrydyzujące fragmenty badanego DNA wykrywane są poprzez autoradiografię. Jako odnośnik w metodzie sekwencjonowania genomowego stosowany jest ten sam badany fragment DNA klonowany w wektorze M13mp, co pozbawia go metylacji. Brak pasma hybrydyzacyjnego we fragmencie genomowego DNA,



Ryc. 3. Schemat metody sekwencjonowania genomowego. Tylko fragmenty posiadające nienaruszony koniec 3' są wykrywane przez autoradiorafię.

http://rcin.org.pl

a jego obecność w odnośnikowym DNA świadczą o występowaniu w tej pozycji 5-metylocytydyny. Stosując pozostałe odczynniki jak w metodzie Maxama–Gilberta można oznaczyć pełną sekwencję analizowanego fragmentu DNA. Powyższą metodę stosowano do badania struktury szeregu genów [101–103] oraz miejsc oddziaływań DNA — białko [104–106].

Inna metoda stosowana do określania pozycji 5-metylocytydyny zakłada użycie nadmanganianu potasu jako czynnika modyfikującego, który w środowisku kwaśnym reaguje znacznie szybciej z metylowaną cytydyną niż z cytydyną [107]. W tym przypadku wzmocnienie pasma na autoradiogramie świadczy o obecności metylowanej cytydyny w tej pozycji.

Kolejna odmiana metod sekwencjonowania wykorzystuje właściwość hamowania aktywności nukleazowej egzonukleazy III przez tiofosforanowe analogi nukleotydów [108]. Wprowadzenie tioanalogów do łańcucha DNA uzyskano w reakcji syntezy drugiej nici przez fragment Klenowa polimerazy I DNA, przy czym w czterech różnych reakcjach stosowano za każdym razem tioanalog innego nukleotydu. Hydroliza egzonukleazą III doprowadziła do uzyskania spektrum fragmentów DNA kończących się wbudowanym tioanalogiem nukleotydu. Zaletą tej metody, według jej autorów, jest znacznie mniejsze prawdopodobieństwo popełnienia błędów w odczycie sekwencji niż w metodzie Sangera.

Natomiast metoda sekwencjonowania fragmentów polipirymidynowych występujących w genomie (w ilości rzędu 10^5–10^6 zasad w segmentach do 200 nukleotydów), polega na połączeniu metody chemicznej i enzymatycznej [109].

W ostatnich latach szybko wzrasta znaczenie metody amplifikacji DNA do otrzymywania dużych ilości wybranych krótkich fragmentów (kilkaset nukleotydów). Pozwala to ominąć etap namnażania DNA w fagu M13 (rozdział 4). Amplifikacja z udziałem dwóch primerów i fragmentu Klenowa polimerazy I DNA z *E. coli* prowadzi do uzyskania nawet $3x10^5$ kopii DNA [110]. Pozwala to na określenie wybranej sekwencji DNA wyodrębnionego z pojedyńczego włosa ludzkiego [111]. Amplifikacja odcinków genomu ludzkiego o dużej zmienności znalazła zastosowanie w testowaniu chorób genetycznych [112, 113] a także przy identyfikacji osobników np. w kryminalistyce [114–116].

VIII. Sekwencjonowanie krótkich oligonukleotydów

Obecnie stosowane są często krótkie odcinki DNA (od kilku do kilkudziesięciu nukleotydów) jako primery do sekwencjonowania ukierunkowanej mutagenezy, polilinkery stosowane w klonowaniu fragmentów DNA oraz sondy hybrydyzacyjne. Chociaż syntezę oligonukleotydów prowadzi się obecnie automatycznie, według zaprogramowanej uprzednio sekwencji, niekiedy zachodzi potrzeba weryfikacji sekwencji nukleotydów w otrzymanym fragmencie DNA. Opisane wcześniej metody sekwencjonowania dają najlepsze rezultaty dla fragmentów o długości 50–300 nukleotydów. Stąd też zaistniała konieczność modyfikacji tych procedur lub opracowania odrębnych metod sekwencjonowania dla fragmentów krótkich. Najwcześniej opisaną jest metoda tzw. „wędrującej plamki" [117, 118]. Podstawą metody jest dwukierunkowy rozdział fragmentów DNA powstałych po hydrolizie egzonukleazą. Jako pierwszy kierunek stosuje się elektroforezę na octanie celulozy a następnie dalszy rozdział metodą chromatografii cienkowarstwowej. Po autoradiografii sekwencja analizowana jest na podstawie położenia danego fragmentu w stosunku do fragmentu krótszego o jeden nukleotyd.

Black i Gilham [119] wykorzystali chromatografię cienkowarstwową w oznaczaniu sekwencji. DNA hydrolizowano fosfodwuesterazą ze śledziony i znakowano. Rozwijano w jednym kierunku i hydrolizowano „in situ". Chromatografia w drugim kierunku pozwalała na identyfikację 5' końcowych nukleotydów (także modyfikowanych) i odczytanie sekwencji.

Zmodyfikowaną metodę chemiczną Maxama–Gilberta stosowano z powodzeniem nawet dla tetranukleotydów dobierając odpowiednio czynniki modyfikujące i warunki reakcji [120, 121]. Sekwencjonowanie z zastosowaniem podłoża stałego znacznie zwiększyło w tym przypadku szybkość analizy sekwencji [122].

Metoda spektrometrii masowej [123–125], aczkolwiek bardzo szybka ma ograniczone zastosowanie z uwagi na możliwość odczytywania sekwencji co najwyżej 16 zasad w łańcuchu oraz konieczność posiadania skomplikowanej i kosztownej aparatury.

IX. Automatyzacja sekwencjonowania DNA

Zastosowanie do sekwencjonowania DNA dwóch podstawowych metod Maxama–Gilberta [4, 13] oraz Sangera [32, 33] pozwoliło na zgromadzenie informacji o sekwencjach DNA o sumarycznej długości rzędu 10^7 pz, które zebrano w komputerowych bankach sekwencji: GenBank [126] oraz banku EMBL [127]. Jest to niewiele zważywszy na podejmowany wielki projekt sekwencjonowania genomu ludzkiego [128–130] liczącego ok. $3x10^9$ pz. Koniecznością stało się więc znaczne zwiększenie szybkości procesu sekwencjonowania przez jego automatyzację. Jednym z pierwszych kroków w tym kierunku było skonstruowanie automatycznego czytnika autoradiogramów. Czytnik połączony z komputerem posiadającym odpowiednie oprogramowanie [131] koryguje krzywizny linii na autoradiogramie, usuwa artefakty oraz analizuje pasma bardzo słabo rozdzielone. Skonstruowany przez firmę Bio-Rad czytnik autoradiogramów Gen-Master

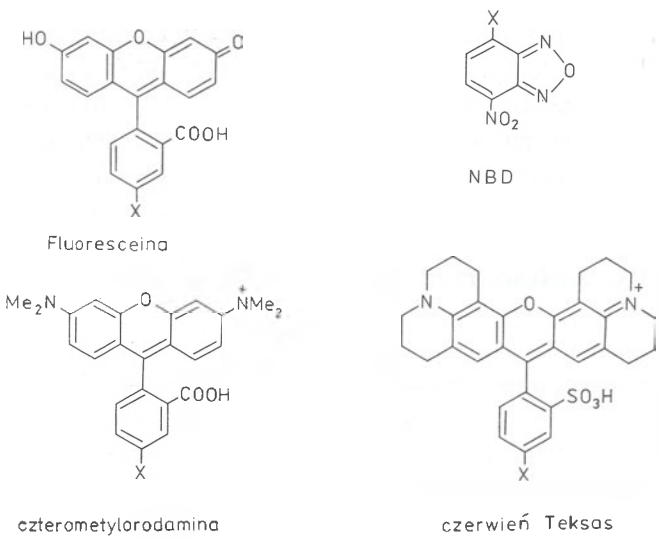
 http://rcin.org.pl

wykonuje wszystkie te operacje i jest w stanie odczytywać sekwencje z szybkością 10^5 zasad dziennie, a przy współpracy z większą ilością komputerów 10-krotnie więcej z dokładnością 99% [132]. To usprawnienie nie eliminuje jednakże tradycyjnego sposobu przeprowadzenia całego procesu sekwencjonowania. Inne projekty zakładają zastosowanie mikrorobotów do sekwencjonowania metodą Maxama–Gilberta [133] lub Sangera [134].

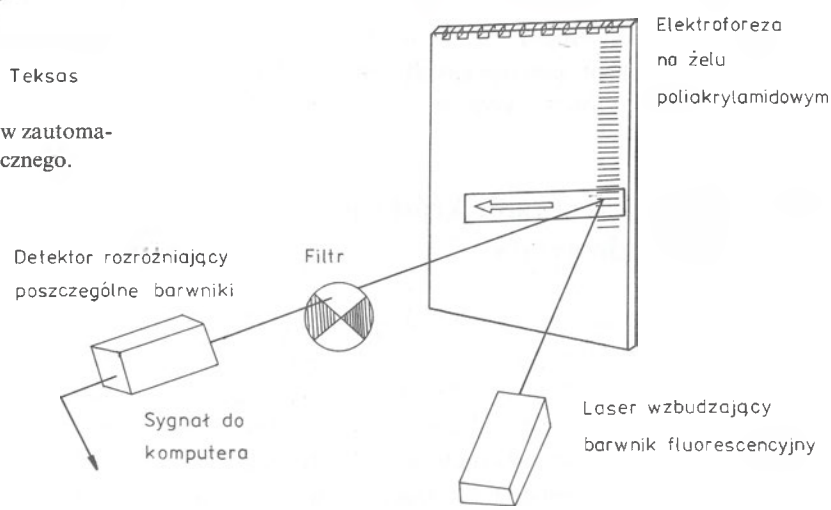
Prawdziwym przełomem w automatyzacji procesu sekwencjonowania było zastosowanie fluoroscencyjnych primerów w metodzie Sangera [135, 136]. Do końca 5' primera przyłączono chemicznie barwnik fluoroscencyjny jako grupę znacznikową [137], przy czym w każdej z reakcji sekwencjonowania stosowano inny barwnik fluoroscencyjny. Po rozdziale elektroforetycznym całej mieszaniny poreakcyjnej na jednej ścieżce żelu poliakryloamidowego automatycznie wykrywano rodzaj fluoroforu i określano sekwencję DNA.

Przy doborze poszczególnych fluoroforów kierowano się następującymi kryteriami: 1. położenie maksimów widm absorpcji fluoroforów może być zróżnicowane w niewielkim stopniu i znajdować się w części widzialnej widma ażeby do wzbudzenia fluoroscencji można było zastosować monochromatyczne światło laserowe, 2. widma emisji poszczególnych fluoroforów muszą się różnić na tyle aby umożliwić ich identyfikację, 3. intensywność fluorescencji powinna być wystarczająca do wykrycia fragmentów DNA, 4. obecność fluoroforu w primerze nie powinna utrudniać procesu hybrydyzacji, 5. ponadto, ich obecność nie powinna zaburzać względnych szybkości migracji fragmentów na żelu poliakryloamidowym. Stosunek dNTP/ddNTP powinien być tak dobrany aby zapewnić równy udział molowy fragmentów o długości 1–350 nukleotydów z uwagi na pojedyńczą grupę reporterową. Zasadę działania pierwszego aparatu do automatycznej analizy sekwencji DNA firmy Applied Biosystem [138] przedstawia ryc. 5.

Fragmenty DNA zawierające na swym końcu 5' barwnik fluoroscencyjny są wzbudzane w dolnej części żelu światłem laserowym. Liniowo spolaryzowany promień lasera przechodzi przez płytę pod kątem 56^0 celem maksymalnej redukcji rozpraszania promieniowania. Laser oraz układ zbierający dane w 194 punktach żelu przesuwają się prostopadle do kierunku elektroforezy. Optyka układu zbierającego zawiera filtry wybierające 4 różne długości fali. Następnie sygnał jest wzmacniany przez fotopowielacz i analizowany przez komputer. Po 12 godzinach elektroforezy uzyskano informację o sekwencji około 400 nukleotydów, co przy 16 ścieżkach rozdziału daje sekwencję około 6000 nukleotydów przy wykrywalności rzędu 10^{-16} – 10^{-15} mola fluoroforu w prążku. Zastosowanie komputera do analizy danych pozwala na 1. obniżenie poziomu szumów 2. określenie stężenia każdego z barwników jako funkcji czasu 3. korekcję zmian w migracji 4. poprawę rozdzielczości pików 5. przypisanie sygnałów poszczególnym zasadom. Stwierdzono, że precyzja metody zależy od stosunku ilości primera do matrycy, temperatury reakcji polimeryzacji oraz stosowanej polimerazy. Najlepsze rezultaty osiągnięto przy stosunku primer/matryca 2:1 i temperaturze reakcji wynoszącej 16^0C [139]. Ze stosowanych polimeraz fragment Klenowa polimerazy I DNA z *E. coli* pozwalał osiągnąć precyzję rzędu 94%, a w przypadku zastosowania sekwenazy wynosiła ona 97–99% [139]. Podobną zasadę wykorzystano przy budowie automatycznego aparatu do sekwenc-



Ryc. 4. Fluorofory stosowane do znakowania primera w zautomatyzowanej wersji sekwencjonowania enzymatycznego.



Ryc. 5. Uproszczony schemat działania aparatu do automatycznego sekwencjonowania DNA firmy Applied Biosystems wg [136, 138].

http://rcin.org.pl

jonowania DNA w laboratorium EMBL w Heidelbergu z tą różnicą, że stosowano jeden primer z przyłączoną fluoresceiną [140]. Po reakcji z 4 terminatorami fragmenty rozdzielano elektroforetycznie podobnie jak w tradycyjnej metodzie Sangera (rozdział 3) na 4 oddzielnych ścieżkach. System detekcji był podobny do wyżej opisanego.

Metoda proponowana przez badaczy z firmy Du Pont i Kalifornijskiego Instytutu Technologicznego polega na zastosowaniu do metody Sangera znakowanych fluorescencyjnie terminatorów [141]. Do pirymidyn w pozycję 5 oraz puryn w pozycję 7 przyłączono pochodne fluoresceiny za pomocą mostka acetylenowego. Różniły się one położeniem grup metylowych w pierścieniu barwnika. Mimo tej niewielkiej różnicy widma emisji fluorescencji poszczególnych fluoroforów różnił się wystarczająco dla ich rozróżnienia przez detektor. Jako polimerazę stosowano odwrotną transkryptazę lub sekwenazę gdyż fragment Klenowa nie włącza tych dwudezoksypochodnych do syntetyzowanego łańcucha DNA. Metoda z zastosowaniem znakowanych fluorescencyjnie dwudezoksy terminatorów ma szereg zalet: 1. umożliwia dowolny wybór wektora 2. daje możliwość prowadzenia 4 reakcji w jednej probówce 3. wykrywane są tylko fragmenty zawierające fluorofory na końcu 3' co eliminuje szereg artefaktów obserwowanych w przypadku stosowania fluorescencyjnego primera 4. podobieństwo chemiczne barwników nie wywołuje żadnych komplikacji w kolejności elucji.

Impulsem do intensywnego rozwoju automatycznych technik sekwencjonowania był, jak już wspomniano, projekt sekwencjonowania genomu ludzkiego [128–130]. Według obecnych szacunkowych obliczeń projekt ten pochłonąłby ok. 600 mln $ w ciągu 15 lat [129]. Opracowanie metod seperacji chromosomów [142–146], oraz metod klonowania dużych fragmentów DNA [147] a zwłaszcza postęp technologiczny w metodach sekwencjonowania czynią ten projekt możliwym do zrealizowania.

Artykuł otrzymano 22 września 1988 r.
Zaakceptowano do druku 10 listopada 1989 r.

Piśmiennictwo

1. Deininger P. L., (1983), *Anal. Biochem.*, **129**, 216–223
2. Hindley J.(1983), w: DNA sequencing, red. Work T.S., Burton R.H., Academic Press Amsterdam, New York, London
3. Moores J. C., (1987), *Anal. Biochem.*, **163**, 1–8
4. Maxam A. M., Gilbert W., (1980), *Methods in Enzymol.*, **65**, 499–560
5. Maniatis T., Fritsch E. F., Sambrook J., (1982), w: Molecular cloning a laboratory manual, Cold Spring Harbour Laboratory, New York
6. Nucleic acids labelling, (1987), Amersham International plc, UK
7. Tu C–P. D., Cohen S. N., (1980), *Gene*, **10**, 177–183
8. Deininger P. L (1983), *Anal. Biochem.*, **135**, 247–263
9. Anderson S., (1981), *Nucleic Acids Res.*, **9**. 4087–4098
10. Chu B. C., Orgel L. E., (1985), *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **82**, 963–967
11. Dreyer .B., Dervan P. B., (1985), *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, *82*, 968–972
12. Kessler C., Neumaier T. S., Wolf W. (1985), *Gene*, **33**, 1–102
13. Maxam A. M., Gilbert W., (1977), *Proc. Natl Acad Sci. U. S. A.*, **74**, 560–564
14. Szczakiel G., Brune M., (1986), *Nucleic Acids Res.*, **14**, 10120–10121
15. Rüther U., Koenen M., Otto K., Müller–Hill B., (1981), *Nucleic Acids Res.*, **9**, 4087–4097
16. Messing J., Crea R., Seeburg P. H., (1981), *Nucleic Acids Res.*, **9**, 309–321
17. Volckaert G. de Vleeschouer E., Blocker H., Frank R., (1984), *Gene Anal. Techn.*, **1**, 52–59
18. Eckert R. L., (1987), *Gene*, **51**, 247–254
19. Krayev A. S., (1981), *FEBS Lett.*, **130**, 19–22
20. Friedmann T., Brown D. M., (1978), *Nucleic Acids Res.*, **5**, 615–622
21. Simoncits A. Török I., (1982), *Nucleic Acids Res.*, **10**, 7959–7964
22. Saito I., Sugiyama H., Matsura T., Ueda K., Komano T., (1984), *Nucleic Acids Res.*, **12**, 2879–2885
23. Rosenthal A., Jung R., Hunger H–D., (1986), *Gene*, **42**, 1–9
24. Skryabin A. G., Zakharyev V. M., Baev A. A., (1978), *Dokl. Akad. Nauk U. S. S. R.*, **241**, 488–490
25. Rubin C. M., Smith C. W., (1980), *Nucleic Acids Res.*, **8**, 4613–4619
26. Sverdlov E. D., Kalinina N. F., (1983), *Bioorg. Khim.* **9**, 1696–1698
27. Mattes W. B., Hartley J. A., Kohn K. W., (1986), *Biophys. Biochim. Acta*, **868**, 71–76
28. Chuvpilo S. A., Kravchenko V. V., (1984), *FEBS Lett.*, **179**, 34–36
29. Jagadeeswaran P., Kaul R. K., (1986), *Gene Anal. Techn.*, **3**, 79–85
30. Ambrose B. J. B., Pless R. C., (1985), *Biochemistry*, **24**, 6194–6200
31. Ambrose B. J. B., Castro M. M., Pless R. C., (1986), *Anal. Biochem.*, **159**, 24–29
32. Sanger F., Nicklen S., Coulson A. R., (1977), *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **74**, 5463–5467
33. Smith A. J. H., (1980), *Methods in Enzymol.* , **65**, 560–580
34. Wallace R. B., Johnson M. J., Suggs S. V., Miyoshi K., Bhatt R., Itakura K., (1981), *Gene*, **16**, 21–26
35. M13 cloning and sequencing system. A laboratory manual, (1984), New England Biolabs, USA
36. Jacobsen H., Klenow H., Overgaard–Hansen K., (1974), *Eur. J. Biochem.*, **45**, 623–627
37. McGraw III R–A., (1984), *Anal. Biochem.* **143**, 298–303
38. Płaza G., (1987), *Post. Biochem.* **33**, 489–500
39. Van Vazenbeek P. M. G. F., Hulsebas T. J. M., Schoenmakers J. G. G., (1980) *Gene*, **11**, 129–148
40. Denhardt D. T., Dressler D., Ray D. S., (1978), w: Single–stranded DNA phages, Cold Spring Harbour Laboratory, New York
41. Baas P. D., (1985), *Biophys. Biochim Acta*, **825**, 111–139
42. Zinder N. D., Boeke J. D., (1982), *Gene*, **19**, 1–10
43. Messing J., Gronenborn B., Müller–Hill B., Hofschneider P., (1977), *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **74**, 3642–3646
44. Gronenborn B., Messing J., (1978), *Nature*, **272**, 375–377
45. Vieira J., Messing J., (1982), *Gene*, **19**, 259–268
46. Messing J., Vieira J., (1982), *Gene*, **19**, 269–276
47. Messing J., (1983), *Methods in Enzymol.*, **101**, 20–78
48. Norrander J., Kempe T., Messing J., (1983), *Gene*, **26**, 101–106
49. Yanish–Peron C., Vieira J., Messing J., (1985), *Gene*, **33**, 103–119
50. Barnes W. M., Bevan M., (1983), *Nucleic Acids Res.*, **11**, 349–368
51. Dente L., Cesareni G., Cortese R., (1983). *Nucleic Acids Res.*, **11**, 1645–1655

 http://rcin.org.pl

52. Dente L., Cortese R., (1987), *Methods in Enzymol.*, **155**, 111–118
53. Dotto G. P., Euca V., Zinder H. D., (1981), *Virology*, **114**, 463–473
54. Dotto G. P., Horiuchi I., (1981), *J. Mol. Biol.*, **153**, 169–176
55. Zagursky R. J., Berman M. L., (1984), *Gene*, **27**, 183–191
56. Levinson A., Silver D., Seed B., (1984), *J. Molec. Appl. Gen.*, **2**, 507–517
57. Smith M., Leung D. W., Gillam S., Astell C. R., Montgomery D. L., Hall B. D., (1979), *Cell*, **16**, 753–761
58. Wallace R. B., Schold M., Johnson M. J., Dembek P., Itakura K., (1981), *Nucleic Acids Res.*, **9**, 3647–3656
59. Hong G. F., (1982), *Bioscience Reports*, **2**, 907–912
60. Lin X–Y., Maeda S., Collier K., Pestka S., (1985), *Gene Anal. Techn.*, **2**, 83–88
61. Chen E. Y., Seeburg P. H., (1985), *DNA*, **4**, 165–170
62. Haltiner M., Kemp T., Tjian R., (1985), *Nucleic Acids Res.*, **13**, 1015–1025
63. Krzyżosiak W. J., Denman R., Cunningham P., Ofengand J., (1988), *Anal. Biochem.*, **175**, 373–385
64. Hattori M., Sakaki Y., (1986), *Anal. Biochem.*, **152**, 232–238
65. Zagursky R. J., Baumeister K., Lomax N., Berman M. L., 1985, *Gene Anal. Techn.*, **2**, 89–94
66. Bartlett J. A., Gaillard R. K., Joklik W. K., (1986), *BioTechniques*, **4**, 208–210
67. Zhang H., Schall R., Browse J., Somerville Ch., (1988), *Nucleic Acids Res.*, **16**, 1220–1221
68. *Focus*, (1987), **9**, 3, 12–13
69. *Focus*, (1985), **7**, 1, 6–8
70. Zimmern D., Kaesberg P., (1978), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **75**, 4257–4261
71. *BioRad Bulletin* (1984) 1205, 1–4
72. Karathanasis S., (1982), *Focus*, **4**, 3, 6–7
73. Krawetz S. A., (1987), *BioTechniques*, **5**, 620–627
74. Tabor S., Richardson Ch. C., (1987), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **84**, 4767–4771
75. Shengyu Y., Hong G., (1987), *Scientia Sinica Ser. B.*, **30**, 503–506
76. Axelrod V. D., Vartikyan R. M., Aivazoshvilli V. A., Rebelashuilly R. S., (1978), *Nucleic Acids Res.*, **5**, 3549–3563
77. Axelrod V. D., Kramer F. R., (1985), *Biochemistry*, **24**, 5716–5723
78. Klement J. F., Ling M–L., McAllister W. T., (1986), *Gene Anal. Techn.*, **3**, 59–66
79. Parvin J. D. Smith F. I., Palese P., (1986), *DNA*, **5**, 167–171
80. Mills D. R., Kramer F. R., (1979), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **76**, 2232–2235
81. Gought J. A., Murray N. E., (1983), *J. Mol. Biol.*, **166**, 1–19
82. Mizusawa S., Nishimura S., Seela F., (1986) *Nucleic Acids Res.*, **14**, 1319–1324
83. Seela F., Tran–Thi Q–H., Franzen D., (1982), *Biochemistry*, **21**, 4338–4343
84. Martin R., (1987), *Focus*, **9**, 1, 8–10
85. Garoff H., Ansorge W., (1981), *Anal. Biochem.*, **115**, 450–457
86. Biggin M. D., Gibson T. J., Hong G. F., (1983), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **80**, 3963–3965
87. Technical Bulletin (1985), DuPont NEN Products U.S.A
88. Ornstein D. L., Kashdan M. A., (1985), *BioTechniques*, **3**, 476–483
89. Williams S. A., Slatko B. E., Moran L. S., DeSimone S. M., (1986), *BioTechniques*, **4**, 138–147
90. Read P. A., Kost T. A., Miller T. J., (1986), *BioTechniques*, **4**, 306–308
91. Sanger F., Coulson A. R., (1978), *FEBS Lett.*, **87**, 107–110
92. Ansorge W., Barker R., (1984), *J. Biochem. Biophys. Methods*, **9**, 33–47
93. *Focus* (1987), **9**, 1, 12
94. Olsson A., Moks., Uhlen M., Gall A. B., (1984), *J. Biochem. Biophys. Methods*, **10**, 83–90
95. Ansorge W., Labeit S., (1984), *J. Biochem. Biophys. Methods*, **10**, 237–243
96. Beck S., Pohl F. M., (1984), *EMBO J.*, **3**, 2905–2909
97. Doerfler W., (1983), *Ann. Rev. Biochem.*, **52**, 93–124
98. Keshet E., Cedar H., (1983), *Nucleic Acids Res.*, **11**, 3571–3580
99. Church G. M., Gilbert W., (1984), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **81**, 1991–1995
100. Saluz H., Jost J. P., (1986), *Gene*, **42**, 151–157
101. Saluz H., Jiricny J., Jost J. P., (1986), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **83**, 7167–7171
102. Little P. F. R., (1984), *Nature*, **310**, 369
103. Nick H., Bowen B., Ferl R. J., Gilbert W., (1985), *Nature*, **319**, 243–246
104. Church G. M., Ephrussi A., Gilbert W., Tonegawa S., (1985), *Nature*, **313**, 798–801
105. Nick H., Gilbert W., (1985), *Nature*, **313**, 795–798
106. Ephrussi A., Church G. M., Tonegawa S., Gilbert W., (1985), *Science*, **227**, 134–140
107. Fritzsche E., Hayatsu H., Igloi G. L., Iida S., Kössel H., (1987), *Nucleic Acids Res.*, **15**, 5517–5528
108. Labeit S., Lehrach H., Goody R., (1986), *DNA*, **5**, 173–177
109. Deugau K. V., Mitchel R. E. J., Birnboim H. C., (1983), *Anal. Biochem.*, **29**, 88–97
110. Wrischnik L. A., Higuchi R. G., Stoneking M., Ehrlich H. A., Arnheim N., Wilson A. C., (1987), *Nucleic Acids Res.*, **15**, 529–542
111. Higuchi R., von Beroldingen C. H., Seusabaught G. F., Erlich H. A., (1988), *Nature*, **332**, 543–546
112. Saiki R. K., Schort S., Faloona F., Mullis K. B., Horn G. T., Ehrlich H. A., Arnheim N., (1985), *Science*, **230**, 1350–1354
113. Castey C. T., (1987) *Science*, **236**, 1223–1229
114. Gill P., Jeffreys A. J., Werrett D. J., (1985), *Nature*, **318**, 577–579
115. Jeffreys A. J., Wilson V., Thein S. L., (1985), *Nature*, **316**, 76–79
116. Ziętkiewicz E., Słomski R., (1989), *Problemy Krym.*, w druku
117. Brownlee G. G., Sanger F., (1969), *Eur. J. Biochem.*, **11**, 395–399
118. Tu C–P. P., Jay E., Bahl C. P., Wu R., (1976), *Anal. Biochem.*, **74**, 73–93
119. Black D. M., Gilham P. T., (1985), *Nucleic Acids Res.*, **3**, 2433–2442
120. *PL*–Analects, (1982), **10**, 1–2
121. Banaszuk A. M., Deugau K. V., Sherwood J., Michalak M., Glick B. R., (1983), *Anal. Biochem.*, **128**, 281–286
122. Rosenthal A., Schwertner S., Hahn V., Hunger H–D., (1985), *Nucleic Acids Res.*, **13**, 1173–1184
123. Gotjahn L., Frank R., Blöcker H., (1982), *Nucleic Acids Res.*, **10**, 4671–4678
124. Pamilo M., Sindana G., Ucella N., (1983), *J. Am. Chem. Soc.* **105**, 5607–5610
125. Gotjahn L., Blöcker H., Frank R., (1985), *Biomed. Mass. Spectrom.* **12**, 514–524
126. Bilofsky H. S., Burks C., Fickett J. W., Goad W. B., Lewitter F. I., Rindone W. P., Swindell C. D., Tung C–S., (1986), *Nucleic Acids Res.*, **14**, 1–4
127. Hamm G. H., Cameron G. N., (1986), *Nucleic Acids Res.*, **14**, 5–9
128. Lewin R., (1986), *Science*, **232**, 1598–1600
129. Roberts L., (1987), *Science*, **237**, 1411–1412
130. Smith L., Hood L., (1987), *BioTechnology*, **5**, 933–939
131. Elder J. K., Green D. K., Southern E. M., (1986), *Mol. Biol. Rep.*, **14**, 417–424
132. West J., (1987), *Mol. Biol. Rep.*, **1**, 1–3
133. Wada A., (1987), *Nature*, **325**, 771–772
134. Informacja prywatna otrzymana od przedstawicieli firmy Beckman
135. Smith L. M., Sanders J. Z., Kaiser R. J., Hughes P., Dodd C., Connell C. R., Heiner C., Kent S. B. H., Hood L. E., (1986), *Nature*, **321**, 674–679
136. Connell C., Fung S., Heiner C., Bridgham J., Chakerian V., Heron E., Jones B., Menchen S., Mordan W., Raff M., Recknor M., Smith L., Spri-

http://rcin.org.pl

nger J., Woo S., Hunkapiller M., (1987), *BioTechniques*, **5**, 342–348
137. Smith L. M., Fung S., Hunkapiller M. W., Hunkapiller T. J., Hood L. E., (1985), *Nucleic Acids Res.*, **13**, 2399–2412
138. DNA sequencing system 370A. Materiały reklamowe firmy Applied Biosystem
139. Johnson-Dow L., Mardis E., Heiner C., Roe B. A., (1987), *Biotechniques*, **5**, 754–765
140. Ansorge W., Sproat B., Stegemann J., Schwager C., Zenke M., (1987), *Nucleic Acids Res.*, **15**, 4593–4602
141. Prober J. M., Trainor G. L., Dam R. J., Hobbs F. W., Robertson C. W., Zagursky R. J., Cocuzza A. J., Jensen M. A., Baumeister K., (1987), *Science*, **238**, 336–341
142. Schwartz D. C., Cantor C. R., (1984), *Cell*, **37**, 67–75
143. Carle G. R., Olson M. V., (1984), *Nucleic Acids Res.*, **12**, 5647–5654
144. Carle G. R., Frank M., Olson M. V., (1986), *Science*, **232**, 65–68
145. Chu G., Vollrah D., Doris R. W., (1986), *Science*, **234**, 1582–1585
146. Den Dunnen J. T., Bakker E., Klein Breteler E. G., Pearson P. L., van Ommen G. J. B., (1987), *Nature*, **329**, 640–642
147. Burke D. T., Carle G. F., Olson M. V., (1987), *Science*, **236**, 806–812

EMBO

New Postdoctoral Fellowships for East European Molecular Biologists

The EMBO Council has decided to use the profits earned by the EMBO Journal to finance a small number of short term fellowships to allow molecular biologists from East European countries to work in laboratories in Western Europe or Israel. In 1991 a maximum of 10 fellowships will be awarded. The deadline for applications is 30 April 1991 and the successful candidates will be notified by 31 May 1991.

The conditions applying to these special fellowships are as follows:

1. applicants must be residents of an East European country and be working in that country at the time of application
2. applicants must hold a PhD degree and be less than 40 years of age
3. the applicants must provide a well defined research proposal to be carried out in a specific host laboratory in Western Europe or Israel
4. the fellowships will be awarded for a period of between three months and a maximum of 6 months. They will not be renewable or extended beyond 6 months
5. the fellowships will provide a subsistence allowan ce and a travel grant but they will not include any financial support for dependents.

Application forms can be obtained from:
The Executive Secretary, EMBO,
Postfach 1022.40, 69 Heidelberg, Germany;
telephone: 49-6221-383031;telefax 49-6221-384879

Rola białek szoku termicznego

Role of the heat shock proteins

BARBARA LIPIŃSKA

Spis treści:

I. Wstęp
II. Rodzina Hsp70
II. 1. Rola Hsp70 w transporcie białek przez błony
II. 2. BiP (Grp78) i jego interakcje z białkami sekrecyjnymi
II. 3. Rola białka DnaK w replikacji DNA bakteriofaga λ
III. Białko GroEl oraz białka homologiczne i ich rola w tworzeniu struktur oligomerycznych
III. 1. Białko GroEL
III. 2. Białko wiążące podjednostki karboksylazy rybulozo-1, 2-dwufosforanu
III. 3. Mitochondrialne białka Hsp58
IV. Rodzina Hsp90
IV. 1. Endoplazmina (Grp94)
IV. 2. Kompleksy Hsp90 z kinazami tyrozynowymi
IV. 3. Rola białek Hsp90 w działaniu hormonów sterydowych
V. Podsumowanie

Contents:

I. Introduction
II. Hsp70 family
II. 1. Role of Hsp70 in protein transport across the membranes
II. 2. BiP (Grp78) and its interactions with secretory proteins
II. 3. Role of DnaK protein in λ DNA replication
III. GroEL and homologous proteins and their role in assembly of oligomeric structures
III. 1. GroEL protein
III. 2. Rubisco subunit binding protein
III. 3. Mitochondrial Hsp58
IV. Hsp90 family
IV. 1. Endoplasmin (Grp94)
IV. 2. Hsp90 complexes with protein kinases.
IV. 3. Role of Hsp90 in functioning of steroid hormones
V. Conclusions

Wykaz stosowanych skrótów: Hsp – białka szoku termicznego, Hsc – białka podobne do białek szoku termicznego, GroEl – białko szoku termicznego u *E. coli*, Grp – białka indukowane niedoborem glukozy, Rubisco – ang. *ribulose biphosphate* carboxylase-oxygenase, Ssb – białko wiążące jednoniciowy DNA, BiP – białko wiążące ciężkie łańcuchy immunoglobulin (ang. – *binding protein*).

I. Wstęp

Komórki prokariotyczne i eukariotyczne, w odpowiedzi na podwyższenie temperatury ponad wartość fizjologiczną lub inne stresy, syntetyzują białka szoku termicznego, czyli białka Hsp. W komórkach nie poddanych stresowi znajdują się białka o bardzo podobnej sekwencji, określane często jako Hsc (ang. *heat shock cognate*). Razem tworzą one rodziny białek Hsp, które charakteryzują się niezwykłą stabilnością w ewolucji. Stosując kryterium masy cząsteczkowej, wyróżnia się rodziny: Hsp90 [80–100 kD], Hsp70 [68–78 kD] i Hsp20 [18–30 kD](patrz artykuł Skowyra, Żylicz, [1] oraz [2–4]). Klasyfikacja ta nie jest idealna i istnieją białka Hsp nie dające się zaliczyć do żadnej z tych rodzin. Wiele prac przeglądowych poświęcono systematyce, analizie genetycznej i regulacji syntezy Hsp, natomiast do niedawna mechanizm ich działania pozostawał w sferze hipotez. Jakie funkcje pełnią te powszechnie występujące białka?

W komórkach ssaków, pod wpływem szoku termicznego, Hsp70 i Hsc70 migrują do jądra komórkowego gdzie tworzą kompleksy z nierozpuszczalnymi agregatami białkowymi tworzącymi się w efekcie podwyższenia temperatury. Odporność tych kompleksów na wysokie stężenie soli wskazuje na istnienie oddziaływań hydrofobowych [5]. Następnie Hsp70 koncentrują się w jąderku, wiążąc się z niekompletnymi rybosomami. Jąderka są bardzo wrażliwe na wzrost temperatury, lecz nadprodukcja Hsp70 ze sklonowanego genu przyspiesza ich powrót do stanu normalnego po ustąpieniu szoku termicznego [6]. Stabilne kompleksy Hsp70 z jąderkami, wytworzone w wyniku szoku termicznego, w warunkach *in vitro* ulegają dysocjacji, do czego niezbędna jest hydroliza ATP [7]. Na podstawie tej obserwacji, Pelham przedstawił hipotezę działania Hsp70 [8]. Wg tej hipotezy, w czasie szoku termicznego, białka ulegają częściowej denaturacji, eksponując rejony hydrofobowe, które oddziaływują ze sobą, co prowadzi do wytworzenia nierozpuszczalnych białkowych agregatów. Hsp70, wiążąc się z hydrofobowymi rejonami, mogą ograniczać niekorzystne interakcje. Następnie, wykorzystując energię hydrolizy ATP, mogą zmieniać swoją konformację i dysocjować z kompleksu. Zmiana konformacji Hsp70 może z kolei indukować zmianę struktury białka związanego z Hsp70 i powodować jego dysocjację. Uwolnione białko miałoby teraz szansę wrócić do konformacji sprzed szoku termicznego. Proces tego typu mógłby uczestniczyć w naprawie uszkodzeń spowodowanych wysoką temperaturą. Do powstania tej hipotezy przyczyniły się także badania nad dysocjacją białka opłaszczającego pęcherzyki błony komórkowej, tzw. klatryny (ang. *clathrin*). W procesie komórkowej endocytozy tworzą się pęcherzyki błony, opłaszczone przez koszyczek złożony głównie z trimerów klatryny (każda podjednostka trimeru zbudowana jest z dwu łańcuchów polipeptydowych). W doświadczeniach *in vitro* wykazano, że białko Hsc70 jest ATPazą odpowiedzialną za uwalnianie z pęcherzyków błon trimerów klatryny, w reakcji zależnej od hydrolizy ATP i że

Dr, Katedra Biologii Molekularnej, Uniwersytet Gdański, Kładki 24, 80-822 Gdańsk.

http://rcin.org.pl

w czasie reakcji Hsc70 tworzy kompleksy z klatryną [9–12].

Ostatnie badania nad cytoplazmatycznymi Hsp70 z drożdży wykazały, że biorą one udział w transporcie białek przez błony. Sugeruje się, że mechanizm ich działania polega na ATP-zależnym rozwijaniu i utrzymywaniu rozwiniętej struktury transportowanych białek [13, 14]. Co się dzieje z transportowanymi białkami wewnątrz retikulum endoplazmatycznego? Retikulum zawiera białko BiP, należące do rodziny Hsp70, o którym wiadomo, że w obecności ATP wiąże przejściowo ciężkie łańcuchy immunoglobuliny, zanim zostaną one włączone w cząsteczkę przeciwciała, a także wiąże preferencyjnie zmutowane lub niewłaściwie ukształtowane białka [15, 16]. Na podstawie powyższych danych P e l h a m wysunął uogólnioną hipotezę funkcjonowania białek typu Hsp70, które według niego mogą wybiórczo wiązać niekompletne lub niewłaściwie ukształtowane białka, zapobiegać ich agregacji oraz rozwijać strukturę polipeptydów, zużywając energię hydrolizy ATP. W ten sposób Hsp70 ma uczestniczyć w formowaniu właściwej struktury białek i przywracać natywną konfrontację białkom zdenaturowanym [17]. W formowaniu struktury białek biorą udział także inne białka należące do rodziny szoku termicznego. Przykładem jest występujące w chloroplastach białko wiążące podjednostki karboksylazy rybulozo-1, 5-dwufosforanu, konieczne do wytworzenia oligomerycznej struktury tego enzymu, a zarazem homologiczne z bakteryjnym białkiem GroEL [18]. GroEL jest białkiem szoku termicznego u *E. coli* i bierze udział w formowaniu białkowych struktur złożonych z wielu podjednostek [3, 18]. Białka homologiczne do GroEL powszechnie występują w mitochondriach, gdzie uczestniczą w zwijaniu (ang. *folding*) polipeptydów [19, 20, 21].

Białka pomocnicze, które zapobiegają tworzeniu niewłaściwych asocjacji i wspomagają wytworzenie właściwych struktur, nie wchodząc w ich skład, określa się coraz częściej mianem „molecular chaperones", czyli białek towarzyszących lub „molekularnych przyzwoitek" [22]. Do kategorii tej można również zaliczyć białka z rodziny Hsp90, wiążące receptory hormonów sterydowych i najprawdopodobniej, zapobiegające w ten sposób niespecyficznemu wiązaniu się receptorów z regulatorowymi rejonami DNA.

Niniejszy artykuł jest przeglądem białek rodziny szoku termicznego pod kątem pełnionych przez nie funkcji. Nie zostały w nim omówione wszystkie Hsp, m.in. pominięto Hsp20, których rola jest bardzo niejasna [23].

II. Rodzina Hsp70

U *E. coli* występuje tylko jedno białko Hsp70, produkt genu *dnaK* [3], natomiast u *Saccharomyces cerevisiae, Drosophila* i ssaków występują rodziny Hsp70, złożone z szeregu białek o podobnych sekwencjach aminokwasów, przy czym określone białko może być kodowane przez kilka kopii genu [1, 2, 23]. Hsp70 wykazują homologię sekwencji rzędu 50% lub wyższą [23] i ich wspólną cechą jest wysokie powinowactwo do ATP [24, 25]. Regulacja syntezy Hsp70 jest bardzo zróżnicowana, czego przykładem może być rodzina Hsp70 ssaków, przedstawiona w Tabeli 1. U ssaków występuje, oprócz głównego białka Hsp70, białko Hsc70, syntetyzowane w znacznych ilościach w warunkach fizjologicznych oraz białko Grp78, obecne w warunkach fizjologicznych oraz indukowane przez głód glukozowy. Ssaki naczelne zawierają dodatkowo Hsx70, indukowane termicznie lecz obecne też w warunkach bezstresowych; jest ono indukowane także przez białko E1a adenowirusa i nie ma odpowiednika w komórkach gryzoni. W wielu doświadczeniach Hsx70 i Hsp70 są nieodróżnialne i określane jako Hsp70 [8].

Tabela 1. Rodzina Hsp70 ssaków

Nazwa białka[1]	Inne nazwy	Regulacja	Uwagi
Hsp70	Hsp72[2]	ściśle indukowane termicznie (2).	główne Hsp.
Hsx70	72K[3], Hsp68[4], Hsp70[2]	indukowane termicznie lecz wysoki poziom podstawowy, indukowane przez E1a, indukowane w cyklu komórkowym (1,2).	ważne białko szoku u naczelnych, brak odpowiednika u gryzoni (1)
Hsc70	p72[2], 73K[3]	wysoki poziom podstawowy, słaba indukcja termiczna (1,2).	enzym dysocjujący klatrynę (2).
Grp78	BiP[5], 80K[1]	wysoki poziom w komórkach sekrecyjnych, indukowane przez głód glukozowy (1, 2, 5).	występuje w retikulum endoplazmatycznym (1).

1. Pelham, 1986 [8]; 2. Watowich i Morimoto, 1988 [158]; 3. Welch i Feramisco, 1984 [25]; 4. Lowe i Moran, 1986 [159]; 5. Munro i Pelham, 1986 [51].

II. 1. Rola białek Hsp70 w transporcie przez błony

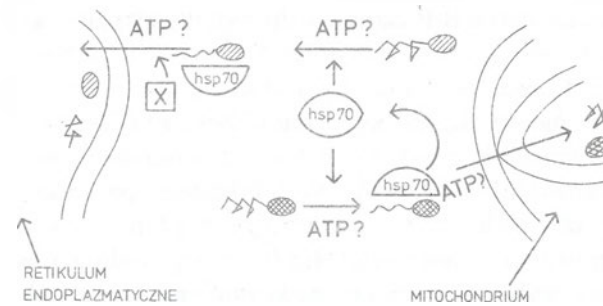
Translokacja prekursorów białek przez błony może zachodzić równocześnie z procesem translacji lub też potranslacyjnie [26–28]. Badania nad potranslacyjnym eksportem białek do mitochondriów i retikulum endoplazmatycznego wykazały, że w obu procesach niezbędna jest hydroliza ATP [29–36]. Jednocześnie wiadomo, że translokacja do wnętrza mitochondriów wymaga aby prekursory białek mitochondrialnych posiadały strukturę rozwiniętą [29, 37, 42]. D e s h a i e s i współautorzy, na podstawie eksperymentów przeprowadzonych na drożdżach, postulowali, że białka z grupy Hsp70 służą jako białka rozwijające

 http://rcin.org.pl

w potranslacyjnym, ATP–zależnym transporcie do mitochondriów oraz do wnętrza retikulum endoplazmatycznego [13].

Saccharomyces cerevisiae mają co najmniej 9 homologicznych genów kodujących Hsp70 [44]. Podgrupę w obrębie genów *hsp70* stanowią geny *ssA* (*ssA1-4*). *SsA1 i ssA2* są transkrybowane konstytutywnie, lecz poziom ich mRNA wzrasta kilkakrotnie w efekcie szoku termicznego, natomiast *ssA3* i *ssA4* ulegają ekspresji tylko w warunkach stresu termicznego. Pojedyncza mutacja w jednym z genów *ssA* fenotypowo nie różni się od typu dzikiego, podczas gdy potrójna mutacja *ssa1ssa2ssa4* jest letalna [45]. Ekspresja genu *ssa1* sklonowanego na plazmidzie przywraca przeżywalność komórek *ssa1ssa2ssa4* [45]. Deshaies i współautorzy badali *in vivo* wpływ produktu genu *ssa1* na traslokację białek [13]. W warunkach istnienia letalnego tła, produkt genu *ssa1* wytwarzany był z plazmidu w sposób kontrolowany. Stwierdzono, że przy braku produktu *ssa1*, komórki nagromadzały w cytoplazmie czynnik prepro-α, białko, które w warunkach fizjologicznych jest transportowane do wnętrza retikulum endoplazmatycznego. Komórki pozbawione produktu *ssa1* akumulowały również prekursor podjednostki β F^1 ATPazy mitochondrialnej, białko, które w warunkach normalnych ulega translokacji do wnętrza mitochondriów.

Badania prowadzone *in vitro* potwierdziły wpływ Hsp70 na translokację białek. Z wcześniejszych badań wiadomo było, że drożdżowy czynnik prepro-α, syntetyzowany w lizacie z kiełków pszenicy nie był efektywnie transportowany poprzez błony mikrosomalne drożdży [46]. Deshaies i współautorzy [13] wykazali, że białka wiążące ATP, izolowane z komórek drożdży produkujących białko *ssa 1*, stymulują translokację w powyższym układzie, natomiast białka wiążące ATP, otrzymane z komórek nie wytwarzających produktu genu, *ssa 1*, nie podtrzymują translokacji. Tak więc, białko *ssal 1* ułatwia translokację czynnika prepro-α do retikulum endoplazmatycznego. Chirico i współautorzy [14] wyizolowali z komórek drożdży białko wiążące ATP o masie cząsteczkowej 70 kD i stwierdzili, że stymuluje ono translokację czynnika prepro-α do mikrosomów drożdży. Wykazali również, że ten preparat białkowy jest mieszaniną dwu białek o tej samej masie cząsteczkowej i różnych punktach izoelektrycznych, produktów genów *ssa 1* i *ssa 2*. Jednocześnie stwierdzono, że działanie białek Ssa można naśladować poprzez traktowanie prekursora czynnika α8M roztworem mocznika. Autorzy postulują, że Hsp70, produkty genów *ssa 1* i *ssa 2*, zużywają energię hydrolizy ATP aby zapobiec zwijaniu się rosnących łańcuchów polipeptydowych, lub żeby je rozwinąć przed translokacją. Oprócz białek Hsp70 przy translokacji białek sekrecyjnych jest niezbędny jeszcze co najmniej jeden czynnik cytoplazmatyczny, który nie wiąże ATP [13, 14]. Hipotetyczna rola Hsp70 w transporcie potranslacyjnym do mitochondrium i retikulum endoplazmatycznego przedstawiona jest na Ryc.1 [13]. Niedawno wykazano, że, *in vitro*, potranslacyjna translokacja czynnika prepro-α drożdży może być stymulowana przez Hsp70 z bakterii, mianowicie przez białko DnaK [47]. Świadczy to o ewolucyjnym zachowaniu funkcji Hsp70.



Ryc. 1. Hipotetyczna rola białek Hsp70 w procesie translokacji białek (wg J. Deshaies i współautorów [13], zmodyfikowano).

Jedna (lub więcej) cząsteczka Hsp70 wiąże się z prekursorem białka mitochondrialnego lub sekrecyjnego. Zużycie ATP może następować na tym etapie lub niezhydrolizowany ATP może być związany z kompleksem. Transport do retikulum endoplazmatycznego wymaga co najmniej jednego dodatkowego czynnika cytoplazmatycznego (czynnik X). Kompleks translokowanego białka i Hsp70 wiąże się z właściwą błoną i w czasie penetracji, ulega dysocjacji po czym Hsp70 mogą być użyte ponownie. ATP może być hydrolizowany w tym etapie, ułatwiając dysocjację.

Czy białka Hsp70 są zaangażowane również w procesie translokacji w komórkach ssaków? Prace zespołu Zimmermana wykazały, że prekursor białka kapsydu bakteriofaga M13 może być transportowany potranslacyjnie w układzie *in vitro* zawierającym frakcję mikrosomalną z trzustki [39, 48]. Transport tego prekusora białkowego jest stymulowany przez dodanie białka z rodziny Hsp70, wyizolowanego ze ssaków [49]. Niewątpliwie interesujące będzie sprawdzenie, czy Hsp70 i aktywność ATPazy są potrzebne również w procesie kotranslacyjnego transportu.

II.2. BiP(Grp78) i jego interakcje z białkami sekrecyjnymi

Białka sekrecyjne są transportowane do wnętrza retikulum endoplazmatycznego, gdzie ulegają glikozylacji, osiągają odpowiednią strukturę trzecio- i czwartorzędową po czym, poprzez aparat Golgiego, są wydzielane na zewnątrz. Typowymi białkami sekrecyjnymi są immunoglobuliny. BiP jest białkiem, które zostało zidentyfikowane jako białko wiążące ciężkie łańcuchy immunoglobulin (ang. *Binding Protein*) w retikulum endoplazmatycznym komórek pre—B, które nie wytwarzają łańcuchów lekkich [50]. Wiązanie to jest typu niekowalencyjnego [51]. BiP wiąże ciężkie łańcuchy również w komórkach B i w komórkach plazmatycznych, przy czym poziom tego białka jest

http://rcin.org.pl

najwyższy w komórkach wydzielających przeciwciała [50, 51]. Okazało się, że BiP jest identyczne (na podstawie badań immunologicznych i mapowania peptydów) z białkiem Grp78, indukowanym przez głód glukozowy i zaliczanym do rodziny Hsp70 [51]. Obecność Grp78 wykazano w fibroblastach pochodzących od różnych gatunków i z szeregu tkanek [52, 53]. Grp78 z wątroby szczura wykazuje ok. 60% homologii z Hsp70 z *Drosophila* i człowieka [51]. Białka te (Grp78/BiP) mają typową N-terminalną sekwencję sygnałową, kierującą je do światła retikulum endoplazmatycznego oraz C-terminalną sekwencję, składającą się z czterech aminokwasów lys-asp-glu-leu, powodującą zatrzymanie białek wewnątrz retikulum [51, 54].

BiP(Grp78) nie ulega indukcji termicznej, natomiast synteza jego jest stymulowana przez czynniki hamujące N-glikozylację białek (np. przez tunikamycynę, glukozoaminę), a także przez niedotlenienie, jonofory wapniowe, analogi aminokwasów i czynniki redukujące grupy S-S, czyli, generalnie, przez czynniki zakłócające wytwarzanie właściwej konformacji białek [51, 55]. Stwierdzono również, że w warunkach zahamowania glikozylacji przez tunikamycynę BiP wykazuje zwiększone wiązanie ciężkich łańcuchów immunoglobuliny, a także hemaglutyniny grypy oraz aktywatora plazminogenu, przy czym BiP znajdowane jest w kompleksach z tymi łańcuchami peptydowymi, które nie utworzyły jeszcze oligomerycznej struktury czwartorzędowej [56–58].

Synteza BiP jest stymulowana przez ekspresję zmutowanych genów hemaglutyniny w komórkach małpy. Tylko zmienione cząsteczki hemaglutyniny, nie mające właściwej konformacji, nie ulegają transportowi z retikulum endoplazmatycznego i indukują syntezę BiP, czyli obecność białek o niewłaściwej konformacji jest sygnałem syntezy BiP [59].

Normalne komórki B wydzielają jedynie ostatecznie uformowane przeciwciała. Okazuje się, że ciężkie łańcuchy immunoglobulin nie posiadające domeny CH1, które nie wiążą się z BiP, są wydzielane szybciej i na różnych etapach tworzenia struktury immunoglobuliny [60]. Zdolność wiązania się z BiP wydaje się więc konieczna do zatrzymania białka, które nie osiągnęło właściwej konformacji.

Badania D o r n e r a i współautorów wykazały, że w linii komórkowej ssaków, w której obniżono ekspresję grp78(BiP) stosując antysensowny RNA, dochodziło do zwiększonego wydzielania białek o zmienionej konformacji [61].

Doświadczenia *in vitro* wykazały, że BiP wiąże się wybiórczo z białkami o niewłaściwej strukturze trzeciorzędowej. K a s s e n b r o c k i współautorzy [62] zastosowali system, w którym translacja białek w ekstrakcie z kiełków pszenicy była sprzężona z translokacją białek poprzez błony mikrosomalne z trzustki psa. Wykazano, że w warunkach zahamowanej glikozylacji BiP tworzy stabilne kompleksy tylko z nieglikozylowaną formą inwertazy drożdżowej (białka, które w normalnych warunkach ulega glikozylacji). Inne białko sekrecyjne, prolaktyna bydlęca, w normalnych warunkach tworzy trzy wewnętrzne mostki dwusiarczkowe. W układzie *in vitro*, zmieniając wartość potencjału red-ox, można regulować ilość wiązań dwusiarczkowych. Okazało się, że białko BiP wybiórczo wiąże się ze zredukowaną formą prolaktyny. Stwierdzono również, że BiP asocjuje tylko z polipeptydami o pełnej długości, tzn. nie tworzy kompleksów z peptydami będącymi w stadium translacji/translokacji [62]. Z badań *in vitro* wynika więc, że BiP wiąże się wybiórczo z białkami o niewłaściwej konformacji, po zakończeniu ich syntezy.

Badanie kompleksów BiP z ciężkimi łańcuchami immunoglobuliny wykazało, że mogą one *in vitro* ulegać dysocjacji w efekcie hydrolizy ATP [51], podobnie jak dzieje się to w przypadku kompleksów Hsp70 z białkami jądrowymi [7], z białkiem opłaszczającym pęcherzyki błony [11], czy z białkiem p53 [63].

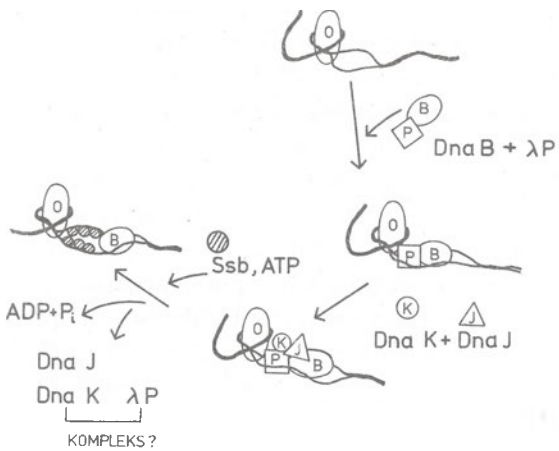
Przedstawione powyżej dane pozwalają sądzić, że BiP łączy się preferencyjnie z białkami o niewłaściwie ukształtowanej strukturze lub z normalnymi białkami, które jeszcze nie osiągnęły właściwej struktury, przez co zapobiega tworzeniu się nierozpuszczalnych lub niewłaściwych agregatów, które mogłyby powstać w efekcie interakcji odsłoniętych rejonów hydrofobowych [17]. Dzięki temu, że wiązanie BiP jest odwracalne w obecności ATP, normalne białka mają szansę wytworzenia właściwej struktury trzecio- i czwartorzędowej.

II.3. Rola białka DnaK w replikacji bakteriofaga λ

U *E. coli* znajduje się jedno białko z rodziny Hsp70, mianowicie produkt genu *dnaK*, w ok. 50% homologiczny z Hsp70 organizmów eukariotycznych [3], posiadający słabą aktywność ATPazy i zdolność do autofosforylacji przy udziale ATP [24, 64]. Gen *dnaK* jest istotny dla bakterii także w warunkach bezstresowych, ponieważ mutanty delecyjne przeżywają jedynie dzięki wytworzeniu mutacji supresorowych w innych genach [24].

Białko DnaK jest niezbędne do inicjacji replikacji bakteriofaga λ [65, 66]. Ryc. 2 przedstawia schematycznie hipotezę inicjacji replikacji DNA faga λ. W pierwszym etapie białko λO rozpoznaje specyficzną sekwencję *ori* λ, po czym dochodzi do związania kompleksu λP-DnaB z λ*ori* [67]. DnaB jest DNA helikazą [68] oraz elementem niezbędnym do przyłączenia prymazy DnaG, syntetyzującej starter RNA, konieczny do zainicjowania syntezy DNA [69]. Jednakże, aktywność helikazy DnaB związanej w kompleksie preinicjującym *ori*λ.λO. λP.DnaB jest zahamowana przez obecność λP [70]. W następnym etapie inicjacji, DnaJ i DnaK wiążą się z kompleksem i warunkują oddysocjowanie λP z kompleksu w reakcji zależnej ATP. Oddysocjowane z kompleksu λP nie wiąże się ponow-

http://rcin.org.pl



Ryc. 2. Hipotetyczna rola białek DnaK i DnaJ w inicjacji replikacji DNA bakteriofaga λ (wg Żylicza i współautorów [72], zmodyfikowano).

Białko λO rozpoznaje sekwencję nukleotydową *ori*λ powodując utworzenie się jednoniciowej struktury, z którą wiąże się kompleks złożony z białek λP i DnaB. W kompleksie: *ori*λ·λO·λP·DnaB, aktywność białka DnaB (które jest helikazą) jest zahamowana obecnością białka λP. Następnie białko DnaJ wiąże się z λP i DnaB a białko DnaK wiąże się z białkiem P, przy czym wykazuje większe powinowactwo do cząsteczek λP uprzednio zasocjowanych z białkiem DnaJ. Hydroliza ATP, najprawdopodobniej katalizowa przez DnaK, powoduje dysocjację kompleksu, w efekcie której uwalnia się λP, oraz białko DnaJ. Helikaza DnaB, uwolniona od λP, rozpoczyna rozwijać spiralę DNA a Ssb, białko wiążące jednoniciowy DNA, zapobiega ponownemu połączeniu się nici.

nie z DnaB, prawdopodobnie dzięki asocjacji z DnaK. Uwolniona w ten sposób helikaza DnaB rozpoczyna rozwijanie podwójnej spirali DNA. DnaG rozpoznaje strukturę: DnaB-jednoniciowy DNA i inicjuje starter RNA [70, 71 i Żylicz, nieopublikowane dane].

Doświadczenia *in vitro* wykazały, że w zależnym od DnaK i DnaJ procesie dysocjacji λP z kompleksu może brać udział również bakteryjne białko GrpE [72], które oddziaływuje z DnaK [73, 74]. Obecność GrpE pozwala na obniżenie stężenia DnaK niezbędnego w replikacji [72]; wiadomo także, że jednoczesna obecność GrpE i DnaJ stymuluje aktywność ATPazową DnaK *in vitro* [Żylicz, nieopublikowane dane].

Rola białka DnaK w replikacji potwierdza hipotezę Pelhama, który sugerował udział Hsp70 w dysocjacji kompleksów białkowych [8]. Ten szczególny przypadek działania Hsp70 jest niezmiernie interesujący również z tego względu, że pozwolił na określenie funkcji białek GrpE i DnaJ, które są także białkami szoku termicznego, o masach cząsteczkowych odpowiednio 24kD i 37kD [75, 76]. Dotychczas molekularna rola tzw. niskocząsteczkowych białek szoku termicznego była całkowicie nieznana.

Funkcja DnaK w niezakażonej fagiem σ komórce nie jest jasna. Wiadomo, że gen *dnaK* jest negatywnym regulatorem transkrypcji genów szoku termicznego [77]. Białko DnaK efekt ten wywołuje poprzez stymulację degradacji i hamowania syntezy czynnika σ^{32}, współdziałającego z polimerazą RNA w czasie transkrypcji genów szoku termicznego [78]. Molekularny mechanizm tego zjawiska nie jest wyjaśniony. Jedna z możliwych hipotez sugeruje, że DnaK stymuluje dysocjację czynnika σ^{32} z kompleksu polimerazy RNA, co może powodować zwiększoną podatność σ^{32} na działanie proteaz komórkowych [78]. Mutacje w genach *dnaJ* oraz *grpE* mają podobny do mutacji *dnaK* wpływ na syntezę i stabilność σ^{32} [78]. Być może, i w tym procesie, podobnie jak w replikacji λ DNA, białko DnaK współdziała z DnaJ i GrpE.

Wykazano również, że mutacje w genie *dnaK*, podobnie jak i w genach *dnaJ*, *grpE* oraz *groEL*, powodują drastyczne obniżenie zdolności komórki bakteryjnej do degradacji anormalnych białek [79]. Równocześnie wykazano, że DnaK, podobnie jak jego analogi w komórkach eukariontów [62], w warunkach *in vitro* preferencyjnie wiąże się ze zdenaturowanymi białkami (Johnson, nieopublikowane dane). Dane te sugerują, że białka szoku termicznego biorą udział w degradowaniu białek komórkowych o nienormalnej strukturze [80]. Ich rola może polegać na bezpośrednim wiązaniu substratu i np. na rozwijaniu struktury białkowej, co czyniłoby ją bardziej podatną na działanie proteaz.

III. Białko GroEL oraz białka homologiczne i ich rola w tworzeniu struktur oligomerycznych

W niedawno opublikowanej pracy, Hemmingsen i współautorzy zaproponowali aby białka uczestniczące w tworzeniu struktury przestrzennej innych białek — występujące u *Prokaryota* oraz w chloroplastach i mitochondriach *Eukaryota* — określić nazwą "chaperonins" [81]. Funkcję owych "chaperonins" (zwanych też białkami towarzyszącymi) byłoby tworzenie przejściowych kompleksów z podjednostkami białek oligomerycznych, niezbędnych do utworzenia ostatecznej struktury oligomeru (w skład tej ostatecznej struktury białka towarzyszące nie wchodzą [22].

III.1. Białko GroEL

Rejon *groE* u *E. coli* złożony jest z dwu genów, *groEL* oraz *groES*, kodujących polipeptydy o masie cząsteczkowej odpowiednio 65 kD i 15kD. Oba geny są istotne dla przeżycia bakterii również w warunkach bezstresowych lecz ich rola w fizjologii komórki jest niejasna. Stanowią one jeden operon, którego transkrypcja zależy od polimerazy RNA współdziałającej z podjednostką σ^{32}, czyli elementem regulonu szoku termicznego *E. coli* [3,82,83]. Białka GroE występują *in vivo* w postaci oligomerów, a *in vitro* białko GroEL jest 14-merem zbudowanym z dwu nałożonych na siebie pierścieni, po 7 podjednostek każdy [84,85], natomiast białko GroES jest zbudowane z 6—8 pod-

http://rcin.org.pl

jednostek tworzących pojedynczy pierścień [86]. Białko GroEL, podobnie jak niektóre białka Hsp70, jest ATPazą i w obecności Mg-ATP, tworzy kompleksy z GroES [84, 86].

Oba białka GroE są niezbędne na bardzo wczesnym etapie budowy główki bakteriofaga λ, mianowicie przy tworzeniu pierścieniowego oligomeru złożonego z 12 podjednostek, produktów fagowego genu B. Ten 12-mer tworzy tzw. łącznik, na którym budowany następnie jest białkowy kapsyd i który, w późniejszych etapach, wiąże się z ogonkiem fagowym [87]. Produkty genów *groE* biorą także udział w budowaniu ogonka faga T5 [88]. Produkt genu *groEL* współdziała we wbudowywaniu głównego białka kapsydu w strukturę główki faga T4. U mutantów *groEL* białko kapsydu, zamiast tworzyć zorganizowaną strukturę, w formie bezpostaciowych grudek wiąże się z błoną komórkową [89].

Jaka jest rola białek GroE w niezakażonej komórce bakteryjnej? Wykazano, że nadprodukcja GroEL i GroES powoduje supresję temperaturowrażliwości u niektórych mutantów *dnaAts* [90,91]. Sugeruje się, że białka GroE mogą uczestniczyć w tworzeniu oligomeru białka DnaA, niezbędnego w inicjacji replikacji DNA [92].

Analiza genetyczna sugeruje, że GroEL bierze udział w zachowaniu równowagi pmiędzy mono- i tetrameryczną postacią białka Ssb (białka wiążącego jednoniciwy DNA). Stwierdzono, że mutacja w genie *groEL* może znosić temperaturowrażliwy defekt w genie *ssb-1*[93]. Temperaturowraźliwość mutantów ssb-1 jest prawdopodobnie spowodowana tym, że zmutowane białko Ssb nie tworzy tetramerów w podwyższonej temperaturze. Sepresorowa mutacja *groEL411* mogłaby więc przywracać odpowiednie stężenie tetrameru przez zapobieganie dysocjacji lub wspomaganie asocjacji monomerów zmutowanego Ssb [94].

Niedawno wykazano, że białko GroEL wiąże się przejściowo z pewnymi polipeptydami, bezpośrednio po ich zsyntetyzowaniu, natomiast nie tworzy kompleksów z ostatecznie uformowanymi białkami [95]. Dane te wskazują, że GroEL może asystować nie tylko w tworzeniu się struktury oligomerycznej, ale także w osiąganiu właściwej struktury przez pojedyncze polipeptydy.

III. 2. Białko wiążące podjednostki karboksylazy rybulozo-1, 5-dwufosforanu

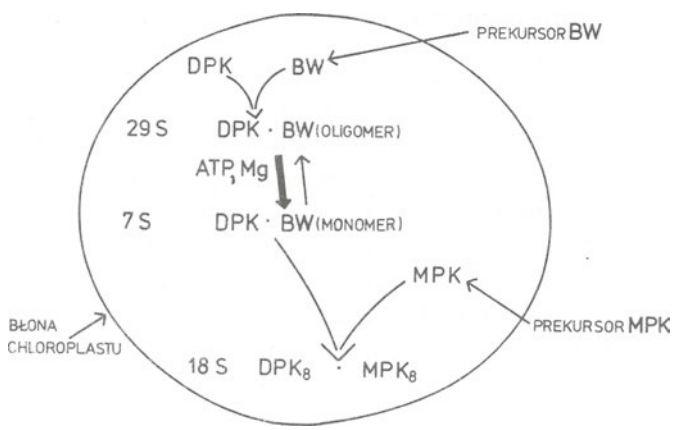
Karboksylaza rybulozo-1,5-dwufosforanu jest centralnym enzymem fotosyntezy katalizującym wiązanie CO_2. Enzym ten, zlokalizowany w *matrix* chloroplastów, zbudowany jest z ośmiu dużych podjednostek (55kD), syntetyzowanych wewnątrz chloroplastów, oraz z ośmiu małych podjednostek (12kD—16kD, zależnie od gatunku), które są syntetyzowane w cytoplazmie i transportowane do wnętrza chloroplastów [22,96].

Badania nad izolowanymi chloroplastami *Pisum sativum* wykazały, że nowosyntetyzowane duże podjednostki karboksylazy występują w kompleksie z białkiem wiążącym, zanim zostaną wbudowane w strukturę holoenzymu, przy czym białko wiążące nie wchodzi w skład holoenzymu karboksylazy[97].

Wykazano, że *in vitro*, w ekstraktach z chloroplastów, ATP i Mg^{+2} powodują dysocjację kompleksu złożonego z dużej podjednostki i białka wiążącego, przy czym w procesie tym niezbędna jest hydroliza ATP. Duże podjednostki, po dysocjacji z kompleksu, mogą być wbudowane w strukturę holoenzymu [96, 98]. Przekonywującym dowodem na to, że białko wiążące pełni istotną rolę w tworzeniu karboksylazy, są doświadczenia Cannon i współautorzy, którzy wykazali, że w układzie *in vitro* przeciwciała skierowane przeciwko białku wiążącemu hamują włączanie się dużych podjednostek do holoenzymu karboksylazy [99]. Równocześnie wiadomo, że duże podjednostki karboksylazy, w nieobecności białka wiążącego, tworzą nierozpuszczalne agregaty *in vitro*, a także *in vivo* w komórkach *E. coli*, w których zachodzi ekspresja sklonowanych genów karboksylazy z roślin wyższych [100, 101].

Dotychczas zgromadzone dane pozwalają sądzić, że białko wiążące tworzy kompleksy stabilizujące duże podjednostki karboksylazy, zapobiegając powstawaniu niewłaściwych agregatów i umożliwiając utworzenie ostatecznej struktury holoenzymu.

Badania Musgrove i współautorów [102], dotyczące białka wiążącego z chloroplastów *Pisum sativum* wskazują, że jest ono oligomerem o wzorze $\alpha_6\beta_6$, gdzie



Ryc. 3. Hipotetyczny udział białka wiążącego w tworzeniu holoenzymu karboksylazy rybulozo-1, 5-dwufosforanu (wg Cannon i współautorów [99], zmodyfikowano).

Duże podjednostki karboksylazy (DPK), syntetyzowane wewnątrz chloroplastów, tworzą kompleks z białkiem wiążącym (BW), transportowanym z cytoplazmy. Kompleks (stała sedymentacji 29S), złożony z oligomeru białka wiążącego i dużej podjednostki karboksylazy, pod wpływem ATP i Mg^{2+} dysocjuje, w efekcie czego powstaje duża podjednostka karboksylazy związana najprawdopodobniej z jedną podjednostką białka wiążącego (BW monomer), o stałej sedymentacji 7S. Duże podjednostki z kompleksu 7S asocjują z małymi podjednostkami (MPK) transportowanymi z cytoplazmy, tworząc holoenzym złożony z 16 podjednostek.

http://rcin.org.pl

podjednostki α i β mają masę cząsteczkową odpowiednio 62kD i 60kD i są syntetyzowane w cytoplazmie. Oligomery te dysocjują *in vitro* pod wpływem ATP i Mg^{+2}. Kompleks z dużą podjednostką karboksylazy zawiera jedną cząsteczkę podjednostki i oligomer białka wiążącego. Udział białka wiążącego w powstawaniu kompleksu przedstawiony jest na Ryc. 3.

We wcześniej opublikowanej pracy opisano białko wyizolowane z liści *Pisum sativum*, bardzo podobne do GroEl w tym, że składa się ono z 14 monomerów ułożonych w dwuwarstwowy pierścień o siedmiokrotnej osi symetrii i wykazuje słabą aktywność ATPazy [103]. Autorzy tej pracy nie porównywali oczyszczonego przez siebie białka z białkiem wiążącym podjednostki karboksylazy, wydaje się jednak prawdopodobne, że są one identyczne. Gdyby to przypuszczenie okazało się słuszne, należałoby zweryfikować stwierdzenie, że białko wiążące ma strukturę $\alpha_6\beta_6$-być może jest to oligomer typu $\alpha_7\beta_7$, zawierający w sumie 14 podjednostek, podobnie jak GroEL [84,85]. Wiadomo na podstawie sekwencji DNA, że podjednostka α jest w 46% homologiczna z białkiem GroEL [81]. Jest więc wysoce prawdopodobne, że podobieństwo to dotyczy także ultrastruktury. Ostatnie badania wykazały również, że w komórkach *E. coli*, w których dochodzi do ekspresji genów karboksylazy z sinicy, do wytworzenia odpowiedniej struktury karboksylazy konieczne są produkty genów *groEL* oraz *groES* [104].

Podobieństwo struktury i roli jaką pełnią omawiane białka chloroplastów i bakterii w tworzeniu struktur oligomerycznych pozwala sądzić, że są to ewolucyjne homologi.

III.3. Mitochondrialne białka Hsp58

Ostatnie doniesienia wykazały, że w mitochondriach *Tetrahymena thermophila* znajduje się białko o względnej masie cząsteczkowej 58 000, które immunologicznie oraz strukturalnie (na podstawie analizy sedymentacyjnej i mikroskopiii elektronowej) jest niezwykle podobne do białka GroEL [105,106]. Białko to produkowane jest w cytoplazmie a następnie transportowane do mitochondriów, przy czym poziom jego w efekcie szoku termicznego wzrasta dwu- trzykrotnie i następuje jego akumulacja w mitochondriach [105]. Stosując przeciwciała skierowane przeciwko Hsp58 z *Tetrahymena*, wykazano obecność pokrewnych białek o zbliżonej masie cząsteczkowej w mitochondriach człowieka, *Saccharomyces cerevisiae*, *Xenopus laevis* i kukurydzy [106]. Białko *Saccharomyces cerevisiae* ulega również indukcji termicznej i tworzy oligomery, które mają bardzo zbliżoną stałą sedymentacji i praktycznie identyczną strukturę obserwowaną w mikroskopie elektronowym do białek z *Tetrahymena* i *E. coli* [106]. Na podstawie przedstawionych wyników można sądzić, że białka podobne do GroEL powszechnie występują w mitochondriach.

Badania Ostermanna i współautorów sugerują, że mitochondrialne Hsp58, podobnie jak GroEL u *E. coli* czy białko wiążące w chloroplastach, biorą udział w stabilizowaniu i tworzeniu struktury białkowej wyższego rzędu wewnątrz mitochondriów [21].

IV. Rodzina Hsp90

Sklonowano i zsekwencjonowano geny kodujące białka Hsp90 z szeregu organizmów, a mianowicie z bakterii, pierwotniaków, *Drosophila*, drożdży, kurczęcia, ssaków. Na podstawie analizy DNA stwierdzono, że homologia sekwencji aminokwasowych w białkach Hsp90 organizmów eukariotycznych wynosi ok. 50% oraz, że sekwencje te są homologiczne z Hsp90 z *E. coli* w co najmniej 40% [107]. Białka z rodziny Hsp90 są syntetyzowane w znacznych ilościach w normalnej temperaturze i ulegają dalszej indukcji przez podniesienie temperatury lub inne stresy [2].

U *E. coli* stwierdzono do tej pory obecność tylko jednego genu należącego do rodziny *hsp90*: jest to gen *htpG*, kodujący białko C62. 5 [3]. *htpG* nie jest genem istotnym dla bakterii, ponieważ jego delecja nie jest letalna [108]. Jedynym efektem fenotypowym mutacji *htpG*$^-$ jest temperaturowrażliwość mutantów [109]. Ustalenie funkcji białka C62. 5 wymaga dalszych badań.

Drosophila melanogaster również posiada jeden gen z tej rodziny, którego produkt, Hsp83 jest indukowany termicznie oraz w trakcie oogenezy [110].

U drożdży, *S. cerevisiae*, stwierdzono dwa geny typu *hsp90*, mianowicie *hsp83* i *hsc83*, przy czym ekspresja *hsc83* jest słabiej indukowana przez podwyższenie temperatury. Pojedyńcze mutacje w tych genach powodują temperaturowrażliwość komórek, natomiast podwójna mutacja *hsp83*$^-$ *hsc83*$^-$ jest letalna [111]. Świadczy to, że drożdże wymagają do przeżycia obecności białka typu Hsp90, którego zwiększona ilość jest potrzebna w podwyższonej temperaturze.

U kręgowców znajdują się co najmniej dwa geny z rodziny *hsp90*, ponieważ wykazano, że niezależnie od cytoplazmatycznego Hsp90, wewnątrz retikulum endoplazmatycznego znajduje się nieco większe białko Hsp90, endoplazmina (Grp94) [112,113].

IV.1. Endoplazmina (Grp94)

Endoplazmina jest glikoproteiną o masie cząsteczkowej 90–100kD występującą w retikulum endoplazmatycznym [113, 114]. Analiza sekwencji klonów cDNA endoplazminy wykazała, że jest to białko podobne, jeśli nie identyczne z białkiem Grp94 indukowanym przez niedobór glukozy, i że posiada ok. 50% homologii z Hsp90 drożdży i *Drosophila* [112,115]. Sekwencja DNA wskazuje, że Grp94 rozpoczyna się sekwencją sygnałową, typową dla białek transportowanych przez błony [113]. C-koniec Grp94 zawiera natomiast sekwencję, uważaną za sygnał kot-

http://rcin.org.pl

wiczący białka wewnątrz retikulum endoplazmatycznego, podobnie jak ma to miejsce w przypadku Grp78 (BiP) [113, 116, 117]. Białka Grp94 i Grp78, oprócz wspólnej lokalizacji w retikulum endoplazmatycznym, wykazują bardzo podobną regulację syntezy. Indukowane są mianowicie przez głód glukozowy i czynniki zaburzające tworzenie struktury trzecio- i czwartorzędowej białek [118, 119] oraz przez anormalne białka [120]. Wydaje się wysoce prawdopodobne, że Grp94 może, podobnie jak Grp78(BiP) brać udział w tworzeniu się struktury wyższego rzędu białek sekrecyjnych transportowanych do wnętrza retikulum i w zatrzymywaniu tamże białek o błędnej strukturze [111].

IV.2. Kompleksy Hsp90 z kinazami tyrozynowymi

Cytoplazmatyczne Hsp90 tworzy kompleksy z szeregiem białek o aktywności kinazy tyrozynowej. Od czasu wykrycia kompleksu Hsp90 z $pp60^{src}$ — białkiem wirusa RSV odpowiedzialnym za transformację nowotworową i posiadającym aktywność kinazy [121,122] stwierdzono, że produkty innych onkogenów będące kinazami tyrozynowymi (*yes*, fps, *fes*, *fgr*) asocjują z białkami o masie cząsteczkowej ok. 90kD [123–125]. W przypadku kompleksów z produktami onkogenów *fes* i *fgr* wykazano, że są to rzeczywiście Hsp90 [123]. W przypadku $pp60^{src}$ okazało się, że kompleks tworzy się bezpośrednio po syntezie, a dysocjacja Hsp90 z kompleksu zbiega się w czasie z fosforylacją onkoproteiny, uaktywnieniem jej aktywności kinazowej i wbudowaniem do błony cytoplazmatycznej [121,122]. Na podstawie tych danych sugerowano, że Hsp90 bierze udział w transporcie onkoproteiny do błony, zapewniając jego rozpuszczalność i hamując aktywność. Wiadomo, że wirusowy produkt onkogenu *fes* również asocjuje z Hsp90 bezpośrednio po syntezie i w formie kompleksu jest nieaktywny w procesie autofosforylacji reszt tyrozynowych *in vitro* [124]. Być może, funkcja Hsp90 jaką sugerowano w przypadku $pp60^{src}$ jest bardziej ogólna i białka te pełnią rolę białek towarzyszących w wewnątrzkomórkowym transporcie kinaz.

IV.3. Rola białek Hsp90 w działaniu hormonów sterydowych

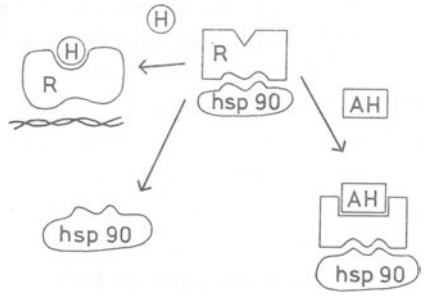
Hormony sterydowe funkcjonują jako aktywatory transkrypcji, przy czym efekt ten wywierają za pośrednictwem białek receptorowych, mających zdolność wiązania hormonów. W obecności hormonu, białko receptorowe wiąże się z sekwencją DNA rozpoznającą receptor, co z kolei stymuluje transkrypcję genu pozostającego pod kontrolą tego rejonu DNA [126].

Analizując receptory w ekstraktach komórkowych stwierdzono, że mogą one występować w dwu formach, o stałej sedymentacji ok. 4S lub 8-10S. Forma 8S otrzymywana jest z cytoplazmy komórek, które nie były traktowane hormonem i jest nieaktywna, tzn. nie wiąże się z DNA. Forma 4S jest aktywna, tzn. łączy się z DNA i jest izolowana z jąder komórek uprzednio poddawanych działaniu odpowiedniego hormonu [127, 128]. Kompleks 8S może być stabilizowany przez molibdenian [129–131]. Badania kompleksów stabilizowanych molibdenianem wykazały, że są to oligomery złożone z receptora hormonu i z białka o masie cząsteczkowej ok. 90kD. Obecność białka 90kD wykazano w kompleksach receptorów progesteronu, estrogenów, glukokortykoidów, androgenów i mineralokortykoidów kurczęcia [132, 133], a także zwierząt innych gatunków [134, 135]. Białko to zostało zidentyfikowane jako białko szoku termicznego, Hsp90 [136–137]. W przypadku receptorów progesteronu i glukokortykoidów dimer Hsp90 wiąże się z jedną cząsteczką receptora [138–139], natomiast w przypadku receptora estrogenu, dimer Hsp90 wiąże się z dwiema cząsteczkami receptora [140]. Ostatnie badania wykazały, że w kompleksie z receptorem glukokortykoidu z komórek mysich zasocjowane są dwie izoformy Hsp90, tzn. dwie cząsteczki Hsp90 różniące się nieco masą cząsteczkową lecz reagujące z tymi samymi przeciwciałami monoklonalnymi [141,142].

W dyskusji szeregu wcześniejszych prac sugerowano możliwość, że kompleksy receptorów z Hsp90 są artefaktami, tworzącymi się w trakcie preparatyki. Wyniki Howarda i Distelhorsta świadczą o tym, że Hsp90 asocjują z receptorem glukokortykoidów w nienaruszonych komórkach i że proces ten jest hamowany przez hormon [143].

Elementy kompleksu 8S połączone są ze sobą słabymi wiązaniami elektrostatycznymi i w warunkach *in vitro* mogą dysocjować pod wpływem wzrostu temperatury lub zwiększonej siły jonowej, przy czym przejściu formy 8S do 4S towarzyszy odłączenie Hsp90 od receptora hormonu [137,141,144]. Badając termicznie indukowaną dysocjację formy 8S receptora glukokortykoidu z komórek myszy stwierdzono, że następuje ona tylko w obecności hormonu i rozpadowi temu towarzyszy przejście receptora ze stanu nieaktywnego do aktywnego, czyli zdolnego do wiązania DNA. Natomiast dysocjacja wywołana wzrostem siły jonowej nie wymaga hormonu i również powoduje wytworzenie aktywnej formy 4S [145]. Wiązanie się receptora z DNA niezależnie od obecności hormonu jest możliwe tylko *in vitro*, *in vivo* proces ten zachodzi wyłącznie przy współudziale hormonu [146–148]. Hipoteza interpretująca powyższe dane, zaproponowana przez Baulieu i Catelli [144] zakłada, że *in vivo* receptor hormonu tworzy kompleks z białkiem Hsp90, które umożliwia interakcję receptora z DNA. Związanie hormonu powoduje dysocjację kompleksu, co z kolei odsłania domenę receptora wiążącą DNA. Zgodnie ze schematem przedstawionym na Ryc. 4 do związania się receptora z DNA nie jest konieczna obecność hormonu, o ile zostanie uprzednio odłączone Hsp90. Badania nad efektem substancji antagonistycznej wobec receptora glukokortykoidów kurczęcia potwier-

http://rcin.org.pl



Ryc. 4. Schemat przedstawiający rolę białek Hsp90 w mechanizmie działania hormonów sterydowych (wg Baulieu i Catelli [144], zmodyfikowano).
W nieobecności hormonu (H), receptor hormonu sterydowego (R) pozostaje w niekowalencyjnym kompleksie z białkiem Hsp90, blokującym miejsce receptora wiążącego DNA. Związanie hormonu powoduje dysocjację Hsp90; receptor wiąże się z DNA i stymuluje transkrypcję. Antyhormon (AH) stabilizuje kompleks receptora z Hsp90.

dzają słuszność przedstawionego schematu. Groyer i współautorzy wykazali, że zarówno w tkankach jak i w ekstraktach komórkowych hormon stymuluje transformację nieaktywnego kompleksu 8S w aktywną formę 4S, natomiast antyhormon sterydowy RU486 stabilizuje kompleks 8S. W kontrolnych doświadczeniach *in vitro*, forma 4S połączona z RU486 wiązała się z DNA podobnie jak forma 4S połączona z hormonem [149]. Stabilizujący wpływ RU486 na kompleksy 8S wykazano również w przypadku receptora prosteronu z macicy królika [150].

Analiza sekwencji DNA Hsp90 z różnych organizmów wskazuje, że białka te posiadają dwa rejony, A i B, o dużej ilości negatywnie naładowanych aminokwasów [139, 151–154]; (Hsp90 z *E. coli* nie posiada rejonu A [155]). Budowę drugorzędowej struktury rejonu A Hsp90 z kurczęcia przedstawia się jako α-spiralę przypominającą DNA ze względu na to, że rozmieszczenie negatywnie naładowanych aminokwasów podobne jest do rozkładu reszt fosforanowych w B-DNA. Struktura taka teoretycznie może zakrywać miejsce, którym receptor wiąże się z DNA [139]. Poparciem tej hipotezy są doświadczenia, w których przeciwciała przeciwko syntetycznemu peptydowi z rejonu A wiązały się z wolnym białkiem Hsp90, natomiast nie reagowały z 8S kompleksem Hsp90-receptor [156].

Podsumowując, Hsp90 zapobiegają nieuzasadnionemu (tzn. bez obecności sygnału-hormonu) oddziaływaniu pomiędzy receptorem a DNA. Pojawia się więc znowu idea "chaperone protein", białka zapobiegającego niewłaściwym interakcjom [22].

Niedawno opublikowana praca, której autorzy wykazali, że ludzki receptor estrogenów może funkcjonować jako regulator transkrypcji w komórkach drożdży, stanowi szansę zastosowania metod genetycznych w badaniu roli Hsp90 w regulacji hormonalnej [157].

V. Podsumowanie

Kilka lat temu, wszystkie prace poświęcone białkom szoku termicznego zaczynały się podobnie, mianowicie, że są to białka powszechnie występujące, indukowane przez różne warunki stresowe, niezwykle dobrze zachowane w ewolucji i skoro tak jest, najprawdopodobniej pełnią niezwykle ważne funkcje. Ostatnie lata przyniosły szereg prac wnikających w molekularne podstawy działania białek z rodziny Hsp. Mimo zróżnicowania białek i procesów, w których działają, generalną zasadą jest tworzenie przejściowych kompleksów z innymi białkami: receptorami hormonów sterydowych, onkoproteinami, koszyczkami klatryny, białkami sekrecyjnymi, karboksylazą rybulozo-1, 5-dwufosforanu, kompleksem replikacyjnym. Te interakcje wydają się prowadzić do: (1) wytworzenia białkowych struktur oligomerycznych, (2) dysocjacji kompleksów, (3) zapobiegania niewłaściwym oddziaływaniom pomiędzy białkami lub pomiędzy białkami a DNA, (4) rozwijania (ang. *unfolding*) polipeptydów. Omawiane kompleksy tworzą się w warunkach fizjologicznych. Jaka jest więc funkcja Hsp w obronie organizmu przed negatywnymi efektami szoku termicznego? Dotychczasowe badania wydają się potwierdzić hipotezę Pelhama, zgodnie z którą białka szoku termicznego powodują dysocjację agregatów wytworzonych w efekcie denaturacji białek i umożliwiają ich powrót do stanu natywngo. Większość kompleksów Hsp z innymi białkami była badana w układach *in vitro*. Dla udowodnienia hipotezy Pelhama potrzebne będzie wykazanie, że postulowane interakcje mają miejsce *in vivo*, w warunkach stresowych.

Artykuł otrzymano 16 maja 1989r.
Zaakceptowano do druku 15 stycznia 1990r.

Piśmiennictwo

1. Skowyra, D., Żylicz, M., (1987), *Post. Biochem.*, **33**, 259–276.
2. Lindquist, S., (1986), *Ann. Rev. Biochem.*, **55**, 1151–1191.
3. Naidhardt, F. C., VanBogelen, R. A., (1987) w *Escherichia coli* and *Salmonella Typhimurium*: Cellular and Molecular Biology, red. Neidhardt, F. C. Ingram, J. L., Low., K. B. Magasanik, B, Schaechter, M., Umbarger, H. I., str. 1334–1345, American Society for Microbiology, Washington D.C.
4. Drlica K., (1984), *Microbiol. Rev.*, **48**, 273–289.
5. Welch, W. J., Suhan, J. P., (1985), *J. Cell Biol.*, **101**, 1198–1211.
6. Pelham, H. R. B., (1984), *EMBO J.*, **3**, 3095–3100.
7. Lewis, M. J., Pelham, H. R. B., (1985), *EMBO J.*, **4**, 3137–3143.
8. Pelham, H. R. B., (1986), *Cell*, **46**, 959–961.
9. Chappell, T. G., Welch, W. J., Schlossman, D. M., Palter, K. B., Schlesinger, M. J., Rothman, J. E., (1988), *Cell*, **45**, 3–13.
10. Ungewickell, E., (1985), *EMBO J.*, **4**, 3385–3391.
11. Braell, W. A., Schlossman, D. M., Schmid, S. L., Rothman, J. E., (1984), *J. Cell Biol.*, **99**, 734–741.
12. Schmid, S. L., Rothman, J. E., (1985), *J. Biol. Chem.*, **260**, 10044–10049.

http://rcin.org.pl

13. Deshaies, R. J., Koch, B. D., Werner—Washburne, M., Craig, E., Schekman, R., (1988), *Nature*, **332**, 800–805.
14. Chirico, W. J., Waters, M. G., Blobel, G., (1988), *Nature*, **332**, 805–810.
15. Haas, I. G. Wabl, M., (1983), *Nature*, **306**, 387–389.
16. Munro, S., Pelham, H. R. B., (1986), *Cell*, **46**, 291–300.
17. Pelham, H., (1988), *Nature*, **332**, 776–777.
18. Hemmingsen, S. M., Woolford, C., van der Vies, S., Tilly, K., Dennis, D. T. Georgopoulos, C. Hendrix, R. W., Ellis, R. J., (1988), *Nature*, **333**, 330–334.
19. McMullin, T. W., Hallberg, R. L., (1987), , *Mol. Cell. Biol.*, **7**, 4414–4423.
20. McMulin, T., Hallberg, R., (1988), *Mol. Cell Biol.*, **8**, 371–380.
21. Ellis, J., (1988), *Nature*, **328**, 378–379.
22. Ostermann, J., Horwich, A. L., Neupert, W., Hartl, F. U., (1989), *Nature*, **341**, 125–130.
23. Lindquist, S., Craig, E. A., (1988), *Ann. Rev. Genet.*, **22**, 631–677.
24. Żylicz, M., LeBowitz, J. H., McMacken, R., Georgopoulos, C., (1983), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 6431–6435.
25. Welch, W. J., Feramisco, J. R., (1985), *Molec. Cell Biol.* **5**, 1229–1237.
26. Zimmermann,. R., Meyer, D. I., (1986), *Trends Biochem. Sci.*, **11**, 512–515.
27. Randall, L., (1983), *Cell*, **33**, 231–240.
28. Toyn, J., Hibbs, A. R., Sanz., P., Crowe, J., Meyer, D. I., (1988) *EMBO J.*, **7**, w druku
29. Pfanner, N., Tropschung, M., Neupert, W., (1987), *Cell*, **49**, 815–823.
30. Eilers, M., Opplinger, W., Schatz, G., (1987), *EMBO J.*, **6**, 1073–1077.
31. Chen, W. -J., Douglas, M. G., (1987), *Cell*, **49**, 651–658.
32. Waters, M. G., Blobel, G. J., (1986), *J. Cell Biol.*, **102**, 1543–1550.
33. Hansen, W., Garcia, P. D., Walter, P., (1986), *Cell*, **45**, 397–406.
34. Rothblatt, J., Meyer, D. I, (1986), *EMBO J.*, **5**, 1031–1036.
35. Perara, E., Rothman, R. E., Lingappa, V. R., (1986), *Science*, **232**, 348–352.
36. Mueckler, M., Lodish, H. F., (1986), *Nature*, **322**, 549–552.
37. Eilers, M., Schatz, G., (1986), *Nature*, **322**, 228–232.
38. Verner, K., Schatz, G., (1987), *EMBO J.*, **6**, 2449–2456.
39. Weich, H., Sagstetter, M., Muller, G., Zimmermann, R., (1987), *EMBO J.*, **6**, 1011–1016.
40. Eilers, M., Hwang, S., Schatz, G., (1988), *EMBO J.*, **7**, 1139–1145.
41. Vestweber, Schatz, G., (1988), *EMBO J.*, **7**, 1147–1151.
42. Rothman, J. E., Kornberg, R. D., (1986), *Nature*, **322**, 209–210.
43. Chappell, T. G., Welch, W. J., Schlossman, D. M., Palter, K. B., Schlesinger, M. J., Rothman, J. E., (1986), *Cell*, **45**, 3–13.
44. Deshaies, R. J., Koch, B. D., Schekman, R., (1988), *Trends Biochem. Sci.*, **13**, 384–388.
45. Werner-Washburne, M., Stone, D. E., Craig, E. A., (1987), *Mol. Cell. Biol.*, **7**, 2568–2577.
46. Waters, M. G., Chrico, W. J., Blobel, G., (1986), *J. Cell Biol.*, **103**, 2629–2636.
47. Waters, M. G., Chrico, W. J., Henriquez, R., Blobel, G., (1989) w Stress induced Proteins, red. Pardue, M. L., Feramisco, J.R., Lindquist, S., UCLA Symposia on Molecular and Cellular Biology New Series, t.96, A. R. Liss, Inc. N.Y.
48. Watts, C., Wickner, W., Zimmermann, R., (1983), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 2809–2813.
49. Zimmermann, R., Sagstetter, M., Lewis, M. J., Pelham, H. R. B. (1988), *EMBO J.*, **7**, 2875–2880.
50. Haas, I. G. Wabl, M., (1983), *Nature*, **306**, 387–389.
51. Munro, S., Pelham, H. R. B., (1986), *Cell*, **46**, 291–300.
52. Hightower, L. E., White, F. P., (1982) w Heat shock, red. Schlesinger, M. J., Ashburner, A., Tissiers, A., str. 369–377, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, York.
53. Rosendez, E., Attenelo, J. W., Grafsky, A., Chang, C. S., Lee, A. S., (1985), *Mol. Cell Biol.*, **5**, 1212–1219.
54. Munro, S., Pelham, H. R. B., (1987), *Cell* **48**, 899–907.
55. Wotowich, S. S., Morimoto, R. I., (1988), *Mol. Cell Biol.*, **8**, 393–405.
56. Bole, D.G., Hendershot, L. M., Kerney, J. F., (1986), *J. Cell Biol.*, **102**, 1558–1566.
57. Gething, M. -J., McCammon, K., Sambrook, J., (1986), *Cell*, **46**, 939–950.
58. Dorner, A. J., Bole, D. G., Kaufman, R. J., (1987), *J. Cell Biol.*, **105**, 2665–2674.
59. Kozutsumi, Y., Segal, M., Normington, K., Gething, M. -J., Sambrook, J., (1988), *Nature*, **332**, 462–464.
60. Hendershot, L., Bole, D., Kohler, G., Kearney, J. F., (1987), *J. Cell Biol.*, **104**, 761–767.
61. Dorner, A., Krane, M., Kaufman, R., (1988), *J. Cell Biochem.*, Suppl. 12D: 276.
62. Kassenbrock, C. K., Garcia, P. D., Walter, P., Kelly, R. B., (1988), *Nature*, **333**, 90–93.
63. Hinds, P. W., Finlay, C. A., Frey, A. B., Levine, A. J., (1987), *Mol. Cell Biol.*, **7**, 2863–2869.
64. Bochner, B. R., Żylicz, M., Georgopoulos, (1986), *J. Bacteriol.*, **168**, 931–935.
65. Friedman, D. E., Olson, E. R., Georgopoulos, C., Tilly, K., Herskowitz, I., Banuet, F., (1984), *Microbiol. Rev.*, **48**, 299–325.
66. McMacken, R, Silver, L., Georgopoulos, C., (1987) w *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: Cellular and Molecular Biology, red. Naidhardt, F. C. Ingram, J. L., Low., K. B. Magasanik, B. Schaechter, M., Umbarger H. I., str. 564–612, American Society for Microbiology, Washington D. C.
67. Wickner, S., (1978), *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **43**, 303–310.
68. LeBowitz, J. H., McMacken, R., (1986), *J. Biol. Chem.*, **261**, 4738–4748.
69. Kornberg, A., (1982), 1982 Supplement to DNA replication, W. H. Freeman, and Co., San Francisco.
70. Dodson, M Eschols, H., Wickner, S., Alfano, C., Mensa-Wilmot, K., Gomes, B., LeBowitz, J. H., Roberts, J. D., McMacken, R. (1986), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 7638–7642.
71. Liberek, K., Georgopoulos, C., Żylicz, M., (1988), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 6632–6636.
72. Żylicz, M. Ang, Liberek, K., Yamamoto, T. Georgopoulos, C., (1988), *Biochim. Biophys. Acta*, **951**, 344–350.
73. Żylicz, M., Ang, D., Georgopoulos, C., (1987), *J. Biol. Chem.*, **262**, 17437–17442.
74. Johnson, C., Chandrasekhar, G. N., Georgopoulos, C., (1989), *J. Bacteriol.*, w druku.
75. Saito, Nakamura, Y., Uchida, H., (1978), *Mol. Gen. Genet.*, **165**, 247–256.
76. Żylicz, M., Yamamoto, T., McKittrick, N., Sell, S., Georgopoulos, C., (1985), *J. Biol. Chem.*, **260**, 7591–7598.
77. Tilly, K., McKittrick, N., Żylicz, M., Georgopoulos, C., (1983), *Cell* **34**, 641–646.
78. Yura, T., Straus, D. B., Erickson, J. W., Gross, C., (1989) w: The bacterial chromosome: structure and functional organization, red. Riley, M., Drlica, K., John Wiley and Sons, New York, New York, w druku.
79. Straus, D. B., Walter, W. A., Gross, C., (1989), *Genes and Development*, w druku.
80. Georgopoulos, C., Ang, D., Maddock,: A.,Raina, S., Lipińska, B., Żylicz, M., (1989) w: The bacterial chromosome: structure and functional organization, red. Riley, M., Drlica, K., John Wiley and Sons, New York, New York, w druku.
81. Hemmingsen, S. M., Woolford, C., van der Vies, S., Tilly, K., Dennis, D. T. Georgopoulos, C. Hendrix, R. W., Ellis, R. J., (1988), *Nature*, **333**, 330–334.
82. Fayet, O., Ziegelhoffer, T., Georgopoulos, C., (1989), *J. Bacteriol.*, w druku.
83. Harendeen, S. L., VanBogelen, R.A., Neidhardt, F. C., (1979), *J. Bacteriol.*, **139**, 185–194.
84. Hendrix, R. W., (1979), *J. Mol. Biol.*, **129**, 375–392.

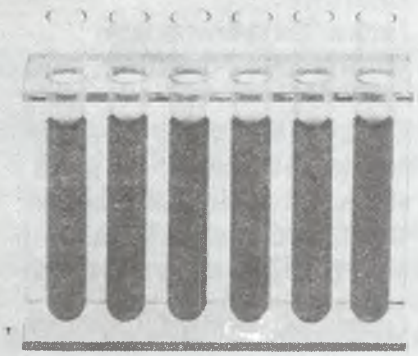
http://rcin.org.pl

85. Hohn, T., Hohn, B., Engel, A., Wurtz, M., Smith, P. R., (1979), *J. Mol. Biol.*, **129**, 359–373.
86. Chandrasekhar, G. N., Tilly, K., Woolford, C., Hendrix, R., Georgopoulos, C., (1986), *J. Biol. Chem.*, **261**, 12414–12419.
87. Kochan, J., Murialdo, H., (1983), *Virology*, **131**, 100–155.
88. ZweigM., Cummings, D. J., (1973), *J. Mol. Biol.*, **80**, 505–518.
89. Takano, T., Kahefuda, T., (1972), *Nature New Biol.*, **239**, 34–37.
90. Fayet, O., Louarn, J. M., Georgopoulos, C., (1986), *Mol. Gen. Genet.*, **202**, 435–445.
91. Jenkins, A. J., Marsh, J. B., Oliver, J. R., Master, M. (1986), *Mol. Gen. Genet.*, **202**, 446–454.
92. Fuller, S., Funnel, B. E., Kornberg, A., (1984), *Cell*, **38**, 889–900
93. Ruben, S., VanDenBrink-Webb, Rein, D., Meyer, R., (1988), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 3767–3771.
94. Wiliams, K., Murphy, J., Chase, J., (1984), *J. Biol. Chem.*, *259*, 11804–11811.
95. Bochkareva, E. S., Lisson, N. M., Girshovich, A. S., (1988), *Nature*, **336**, 254–257.
96. Blom, M. V., Milos, P., Roy, H., (1983), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 1013–1017.
97. Barraclough, R., Ellis, R. J., (1980), *Biochim. Biophys. Acta*, **608**, 19–31.
98. Milos, P., Roy, H., (1984), *J. Cell Biochem.*, **24**, 153–162.
99. Cannon, S., Wang, P., Roy, H., (1986), *J. Cell Biol.*, **103**, 1327–1335.
100. Gatenby, A. A., Castleton, J. A., Saul, M. W., (1981), *Nature*, **291**, 117–121.
101. Gatenby, A. A., Castleton, J. A., (1982), *Mol. Gen. Genet.*, **185**, 424–429.
102. Musgrove, J. E., Johnson, R. A., Ellis, J., (1987), *Eur. J. Biochem.*, **163**, 529–534.
103. Pushkin, A. V., Tsuprun, V. L., Solovjeva, N. A., ShubinV. V., Evstigneeva, Z. G., Kretovich, W. L., (1982), *Biochim. Biophys. Acta*, **704**, 379–384.
104. Goloubinoff, P., Gatenby, A. A, Lorimer, G. H., (1989), *Nature*, **337**, 44–47.
105. McMullin, T. E., Hallberg, R. L., (1987), *Mol. Cell Biol.*, **7**, 4414–4423.
106. McMullin, T. E., Hallberg, R. L., (1988), *Mol. Cell Biol.*, **8**, 371–380.
107. Lindquist, S., Craig, E. A., (1988), *Ann. Rev. Genet.*, *22*, 631–677.
108. Bardwell, J. C. A., Craig, E. A., (1988), *J. Bacteriol.*, **170**, 2977
109. Spence, J., Georgopoulos, C., (1989), *J. Biol. Chem.*, w druku.
110. Blackman, R. K., Meselson, M., (1986), *J. Mol. Biol.*, **188**, 499–515.
111. Deshaies, R. J., Koch, B. D., Schekman, R., (1988), *Trends Biochem. Sci.* **13**, 384–388.
112. Sorger, P. K., Pelham, H. R. B., (1987), *J. Mol. Biol.*, 194, 341–344.
113. Mazzarela, R. A., Green, M., (1987), *J. Biol. Chem.*, **262**, 8875–8883.
114. Koch, G., Smith, Macer, D., Webster, P., Mortara R., (1986), *J. Cell Sci.*, **86**, 217–232.
115. Koyasu, S., Nishida, E., Kadowaki, T., Matsuzaki, F., Iida, K., Harada, F., Kasuga, M., Sakai, H., Yahara, I., (1986), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 8054–8058.
116. Munro, S. Pelham, H. R. B., (1987), *Cell*, **48**, 899–907.
117. Munro, S., Pelham, H. R. B., (1986), *Cell*, **46**, 291–300.
118. Lee, A. S., (1987), *Trends Biochem. Sci.*, **12**, 20–23.
119. Subjeck, J. R., Shyy, T. -T., (1986), *Am. J. Physiol.*, **250**, C1–C17.
120. Kozutsumi, Y., Segal, M., Normington, K., Gething, M. -J., Sambrook, J., (1988), *Nature*, **332**, 462–464.
121. Brugge, J. S., Yuonemoto, W., Darrow, D., (1983), *Mol. Cell Biol.*, **4**, 2697–2704.
122. Courtneidge, S. A., Bishop, J. M., (1982), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 7117–7121.
123. Ziemiecki, A., Catelli, M. G., Joab, I., Moncharmont, B., (1986), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **138**, 1298–1307.
124. Ziemiecki, A., (1986), *Virology*, **151**, 265–273.
125. Lipsich, L. A., Cutt, J. R., Brugge, J. S., (1982), *Mol. Cell Biol.*, **2**, 875–880.
126. Yamamoto, K. R., (1985), *Annu. Rev. Genet.*, **19**, 209–252.
127. Jensen, E. V., Suzuki, T., Kawashima, T., Stumpf, W. E., Jungblut, P. W., DeSombre, E. R., (1968), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **59**, 632–638.
128. Górski, J., Toft, D. O., Shyamala, G., Smith, D., Notides, A., (1968), *Rec. Progr. Hormone Res.*, **24**, 45–80.
129. Nielson, C. J., Sando, J. J., Vogel, W. M, Pratt, W. B., (1977), *J. Biol. Chem*, **252**, 7568–7578.
130. Toft, D., Nishigori, H., (1979), *J. Ster. Biochem.*, **11**, 413–416.
131. Wolfson, A., Mester, J., Yang, C. R., Baulieu, E. E., (1980), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **127**, 71–79.
132. Joab, I., Radanyi, C., Renoir, J. M., Buchou, T., Catelli, M. G., Binart, N., Mester J., Baulieu, E. E., (1984), *Nature*, **308**, 850–853
133. Oblin, M. E., Couette, B., Radanyi, C., Lombes, M., Baulieu, E. E., (1988), *J. Biol. Chem.* w druku.
134. Housley, P. R., Sachnez, E. R., Westphal, H. M., Beato, M., Pratt, W. B., (1985), *J. Biol. Chem.*, **260**, 13810–13817.
135. Redeuilh, G., Moncharmont, B., Secco, C., Baulieu, E. E, (1987), *J. Biol. Chem.*, **262**, 6969–6975.
136. Catelli, M. G., Binart, N., Jung-Testas, I., Renoir, J. M., Baulieu, E. E., Feramisco J. R., Welch, W. J., (1985), *EMBO J.*, 4, 3131–3135.
137. Sanchez, E. R., Toft, D. O., Schlesinger, M. J., Pratt, W. B., (1985), *J. Biol. Chem.*, **260**, 12398–12401.
138. Renoir, J. M., Buchou, Mester, J., Radanyi, C., Baulieu, E. E., (1984), *Biochemistry*, **23**, 6016–6023.
139. Binart, N., Chambrau, B., Dumas, B., Rowlands, D. A., Bigogne, C., Levin, J. M., Garnier, J., Baulieu, E. E., Catelli, M. G., (1988), *J. Biol. Chem.* w druku.
140. Redeuilh, G., Moncharmont, B., Secco, C. Baulieu, E. E., (1987), *J. Biol. Chem.*, **262**, 6969–6975.
141. Mendel, D. B., Bodwell, J. E., Gametchu, B., Harrison, R. W., Munck, A., (1985), *J. Biol. Chem.*, **261**, 3758–3763.
142. Mendel, D. B., Orti, E., (1988), *J. Biol. Chem.*, **263**, 6695–6702.
143. Howard, K. J., Distelhorst, C. W., (1988), *J. Biol. Chem.*, **263**, 3474–3481.
144. Baulieu, E. E. Catelli, M. G., (1989) w Stress-Induced Proteins, red. Pardue, M. L., J., Feramisco, J. R., Lindquist, S., str. 203–219, UCLA Symposia on Molecular and Cellular Biology New Series, vol. 96, Alan R Liss, Inc. New York.
145. Sanchez, E. R., Meshinchi, S., Tienrungroj, W., Schlesinger, M. J., Toft, D., Pratt, W. B., (1987), *J. Biol. Chem.*, **262**, 6986–6991
146. Willmann, T., Beato, M., (1986), *Nature*, **324**, 688–691.
147. Bailly, A., Lepage, C., Rauch, M., Milgrom, E., (1986), *EMBO J.*, **5**, 3235–3241.
148. Becker, P. B., Gloss, B., Schmid, W., Strahle, U., Schutz, G., (1986), *Nature*, **324**, 686–688.
149. Groyer, A., Schweitzer-Groyer, G., Cadepond, F., Mariller, M., Baulieu, E. E., (1987), *Nature*, **328**, 624–626.
150. Renoir, J. M., Radanyi, C., Devin, J., Baulieu, E. E., (1988), *Biochem. J.* wysłane do druku.
151. Blackman, R. K., Meselson, M., (1986), *J. Mol. Biol.*, **188**, 499–515.
152. Farrelly, F. W., Finkelstein, D. B., (1984), *J. Biol. Chem.*, **259**, 5745–5751.
153. Rebbe, N. F., Were, Bertina, R. M., Modrich, P., Stafford, D. W., (1987), *Gene*, **53**, 235–245.
154. Moore, S. K., Kozak, C., Robinson, E. A., Ulrich, S. J., Appella, E., (1987), *Gene*, **56**, 29–40.
155. Bardwell, J. C. A., Graig, E. A., (1987), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 5177—5181.
156. Catelli, M. G., Radanyi, C., Renoir, J. M., Binart, N., Baulieu, E. E., (1988), UCLA Symposia on Stress-Induced Proteins, April 10–16, Keystone, w druku.
157. Metzger, D., White, J. H., Chambon, P., (1988), *Nature*, **334**, 31–36.
158. Watowich, S. S., Morimoto, R. J., (1988), *Mol. Cell. Biol.*, **8**, 393–405.
159. Lowe, D. G., Moran, L. A., (1986), *J. Biol. Chem.*, **261**, 2102–2112.

 http://rcin.org.pl

The protein assay of choice.

More researchers prefer the Bio-Rad protein concentration assay over all others, according to a recent survey. The main reasons are the sensitivity and reproducibility of this popular assay. Speed and convenience of the one-step Bio-Rad assay also rank high among users. In fact, more than 50 million Bio-Rad protein assays have been performed over the last 10 years.



The Bio-Rad protein assay has been cited thousands of times. For details on the assay, a free copy of our updated Applications Bibliography, and a copy of our Methods for Automation, contact:

BIO-RAD

Laboratories Ges.m.b.H.
Auhofstraße 78 D
A-1130 WIEN

Tel. 222/82 89 010
Fax 222/82 85 629
Telex 136565 biora a

It's the Chemistry that Counts.™

Ordering Information

Catalog Number	Product Description	
500-0001	**Bio-Rad Protein Assay Kit I:** 450 ml Dye Reagent Concentrate and lyophilized bovine gamma globulin protein standard. Sufficient for 450 protein assay determinations with standard procedure or 2,250 assays with microassay.	U$ 104,00
500-0002	**Bio-Rad Protein Assay Kit II:** Same as 500-0001, except protein standard is bovine serum albumin.	U$ 104,00
500-0006	**Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate,** 450 ml.	U$ 73,00
500-0005	**Protein Standard I:** Bovine gamma globulin, lyophilized. Will provide 20 ml, 1.4 mg/ml.	U$ 32,00
500-0007	**Protein Standard II:** Bovine serum albumin, lyophilized. Will provide 20 ml, 1.4 mg/ml.	U$ 32,00

http://rcin.org.pl

RECENZJE

„MOLECULAR BIOLOGY OF THE CELL", Second Edition
Bruce Alberts, Dennis Bray, Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts, James D. Watson. Garland Publishing Inc. New York, London, 1989. 1218 stron tekstu oraz indeks. Cena 51,95 dolarów.

„MOLECULAR BIOLOGY OF THE CELL". „THE PROBLEMS BOOK"
John Wilson, Tim Hunt Garland Publishing Company, Inc. New York, London, 1989. 354 strony tekstu, oraz indeks. Cena 14.95 dolarów.

W 1983 ukazało się pierwsze wydanie książki „Molecular Biology of the Cell". Pozycja ta była wielkim wydarzeniem na rynku wydawniczym. O tym zadecydowały moim zdaniem trzy czynniki. Pierwszy to zespół autorski z laureatem Nagrody Nobla z 1962 Jamesem D. Watsonem na czele, który dysponuje wielkim doświadczeniem edytorskim. Drugi czynnik to sposób prezentacji materiału, nasycony rysunkami, zdjęciami i schematami oraz trzeci element to format książki, inny niż dotychczas prezentowany, umożliwiający dodatkowe artykułowanie określonych zagadnień aktualnie omawianych (np. rysunki i schematy na szerokim marginesie).

W związku z tym bardzo celowe okazało się drugie wydanie tego podręcznika. Różni się ono od poprzedniego (tego z 1983) nowym rozdziałem o raku (Rozdział 21) oraz wyodrębnieniem zagadnień kontroli ekspresji genów w formie Rozdziału 10. Książka składa się z trzech części: Introduction to the Cell, The molecular organisation of the Cell oraz From Cells to multicellular organisms, na które składa się 21 rozdziałów. Mimo podobnego układu graficznego i merytorycznego obu wydań to ostatnie jest w wielu miejscach uzupełnione i wyraźnie rozszerzone. Można znaleźć informacje na temat zagadnień niedawno odkrytych jak splicing, kataliza RNA czy RNA editing.

Wspaniałym uzupełnieniem wydania drugiego i nowością jest „The Problems Book". Jest to swego rodzaju przewodnik po tym olbrzymim materiale z zakresu biologii komórki a także stanowi doskonałą pomoc umożliwiającą sprawdzanie opanowanego materiału, proponowanych hipotez, i.t.d..

Układ książki pozwala studiować zawarty tam materiał w dowolny sposób, niekoniecznie zaczynając od początku. Mimo, że tekst ten był pisany przez sześciu autorów jest on jednak jednolity i trudno zauważyć indywidualne obciążenia poszczególnych autorów.

Nie popełnię błędu, jeśli powiem, że drugie wydanie „Molecular Biology of the Cell" stanowi duży standard edytorski w biologii molekularnej, który długo nie będzie doścignięty. Szczerze zachęcam do nabycia tej książki i polecanie jej szczególnie doktorantom.

Jan Barciszewski

„Biospektroskopia"
Opracowanie zbiorowe
pod redakcją Jacka Twardowskiego
Państwowe Wydawnictwo Naukowe, Warszawa 1989
Tom I, 352 strony, 165 rycin, 20 tabel
Tom II, 312 stron, 164 ryciny, 12 tabel
Tom III, 214 stron, 63 ryciny, 8 tabel
Tom IV, 397 stron, 186 rycin, 38 tabel
Tom V, 234 strony, 52 ryciny, 26 tabel

Pięciotomowe opracowanie „Biospektroskopia", którego pierwsze tomy właśnie się pojawiły na rynku stanowi cenne wypełnienie luki podręcznikowej w zakresie metod spektroskopowych w zastosowaniu do materiału badawczego pochodzenia biologicznego. Opracowanie jest ukierunkowane na szeroki krąg czytelników ale głównie może stanowić pomoc dla studentów o kierunku biofizycznym a także doktorantów innych specjalności, którzy pragnęliby zapoznać się z tymi zagadnieniami. Książka daje bardzo szeroki przegląd metod spektroskopowych. Tom I składa się z trzech części: 1. Zastosowanie dyfrakcji promieni Roentgena 2. Spektroskopia mossbauerowska 3. Promieniowanie rentgenowskie

W pozostałych tomach są poruszane następujące tematy:

Tom II: Spektroskopia elektronów, spektroskopia elektronowa UV—VIS, spektroskopia pikosekundowa, spektroskopia MCD i MORD. Tom III: Metody luminescencyjne, absorpcyjna spektroskopia różnicowa i różniczkowa, metody badania słabych emisji fotonowych. Tom IV: spektroskopia Ramana, spektroskopia rezonansowego efektu Ramana, spektroskopia absorpcyjna w podczerwieni. Tom V: spektroskopia fotoakustyczna i inne metody fototermiczne, spektroskopia ultradźwiękowa, działanie pól i promieniowania elektromagnetycznego.

Tak szeroko zakrojone przedsięwzięcie wydawnicze jest pozycją niewątpliwie potrzebną na rynku polskim. Redaktor zadbał aby każdy z rozdziałów pisanych przez różnych przecież autorów napisany był według pewnego schematu ułatwiającego czytelnikowi studiowanie poszczególnych metod spektroskopowych. Każdy rozdział rozpoczyna się wprowadzeniem w podstawy fizyczne zjawiska, zasadę pomiaru, i zastosowanie do badań materiału biologicznego oraz spis literatury umożliwiający czytelnikowi znalezienie pozycji szerzej obejmujących interesujące go szczególnie zagadnienia. Autorzy bogato ilustrują poruszane problemy

http://rcin.org.pl

rycinami ułatwiającymi zrozumienie omawianego materiału. W tomie I należałoby wyróżnić szczególnie rozdział I dotyczący dyfrakcji promieni Roentgena, który zawiera bardzo dokładne i ciekawe omówienie zastosowania tej metody do badania struktury białek, prezentując najnowszy stan wiedzy z tej dziedziny.

Reasumując, pięciotomowe wydanie „Biospektroskopia" powinno znaleźć się w każdej bibliotece instytutowej.

Dariusz Stępkowski

„Virologische Arbeitsmethoden t. III Biochemische und biophysikalische Methoden"
VEB Gustav Fischer Verlag, Jena, 1989
610 stron tekstu

Podręcznik „Virologische Arbeitsmethoden" t. III zgodnie z tytułem, jest obszernym zbiorem biochemicznych i biofizycznych metod stosowanych w badaniach wirusologicznych. Przedstawiono je przede wszystkim w postaci dokładnych przepisów roboczych. W szeregu przypadkach podano również uzasadnienia teoretyczne, wyjaśnienia i komentarze, ułatwiające zrozumienie toku postępowania i możliwości modyfikacji.

Podręcznik dzieli się na 4 części napisane przez różnych autorów. Autorami pierwszej części książki są Rudolf Dernick z Uniwersytetu w Hamburgu i Hanns-Joachim Rziha z Instytutu Wirusologii Weterynaryjnej w Tübingen. Poświęcono ją metodom badania wirusowych kwasów nukleinowych. Pierwsze cztery podrozdziały tej części podręcznika podają metody, które służą do wszechstronnej analizy wirusowego DNA. Pierwszy z nich poświęcono metodom izolowania oraz oczyszczania DNA, drugi metodom identyfikacji i charakteryzowania DNA. Wiele uwagi zwrócono na różnorodne sposoby hybrydyzacji. Techniki klonowania fragmentów wirusowego DNA przedstawiono w rozdziale trzecim uwzględniając przede wszystkim optymalne warunki dla herpeswirusów. Czwarty podrozdział podaje metody analizy sekwencji nukleotydów. Jak sygnalizują autorzy piśmiennictwo nie jest kompletnym zbiorem prac, odnoszących się do zagadnienia; cytowane prace są wybrane przez autorów w sposób subiektywny w celu rozszerzenia informacji.

W drugim rozdziale pierwszej części książki przestawiono metody izolowania biologicznie aktywnego messenger RNA z komórek Eukaryota zakażonych wirusami. We wstępie autorzy podają uwagi ogólne wytyczające sposób postępowania, który winien zabezpieczyć przed enzymatycznym rozkładem RNA. W kolejnych podrozdziałach przedstawiają metody izolowania i oceny biologicznej aktywności RNA oraz przepisy ogólne pozwalające na otrzymanie cDNA.

W części drugiej, której autorami są R. Dernick i J. Heukeshoven z Uniwersytetu w Hamburgu przedstawiono różnorodne metody ilościowego oznaczania białek i peptydów oraz metody analityczne służące do identyfikacji i sekwencjonowania aminokwasów. W obszernym rozdziale poświęconym chromatografii kolumnowej omówiono poszczególne etapy rozwoju metody, przedstawiono podstawy teoretyczne oraz zasady rozdziału białek i peptydów. W podobny ale bardziej obszerny sposób podano różne metody elektroforezy uwzględniając w sposób szczegółowy zastosowanie tych metod w wirusologii.

W kolejnej części książki autorzy (Manfred Wagner z Akademii Nauk w Jenie i Miloš Ryc z Instytutu Higieny i Epidemiologii w Pradze) przedstawiają metody mikroskopii elektronowej i immunomikroskopii elektronowej. We wstępie autorzy zwracają uwagę na niezbędność tych metod w diagnostyce wirusów i określaniu obecności jak i lokalizacji wirusowych antygenów. Te ostatnie możliwości stworzyło powiązanie metod immunologicznych z metodami mikroskopii elektronowej. W sposób szczegółowy autorzy podają przepisy robocze współczesnych metod mikroskopii elektronowej i wytyczne ułatwiające interpretację wyników. W podrozdziale dotyczącym diagnostyki wirusów znajdują się również przepisy dotyczące sposobu obchodzenia się z materiałem klinicznym. Obszerne rozdziały poświęcono metodom immunoelektroskopii elektronowej z zastosowaniem przeciwciał wyznakowanych i niewyznakowanych oraz wyznakowanych i niewyznakowanych lektyn.

Czwartą część książki poświęcono metodom preparatywnego ultrawirowania. Napisał ją Oskar Drees z Uniwersytetu w Hamburgu. Autor poświęca wiele uwagi podstawom teoretycznym tej metody. W sposób wyczerpujący podaje przepisy metod ultrawirowania i możliwości uzyskania żądanych efektów. W sposób szczegółowy omawia metodę wirowania różnicowego, wirowania w gradientach i wirowania izopyknicznego. Sposób przedstawienia metod jest przejrzysty i wyczerpujący. Szczególnie w tej części zrealizowano zamierzenia redakcji by podręcznik mógł służyć również niezbyt jeszcze doświadczonym pracownikom nauki.

Książka „Virologische Arbeitsmethoden" t. III ma 610 stron, 128 rycin i 36 tabel. Jest oprawiona w sztuczną skórę. Koszt książki wynosi 155 DM. Redaktorami są von A. Mayr, P.A. Bachman, B. Mayr-Bibrack i G. Wittmann: została wydana przez VEB Gustav Fischer Verlag w Jenie.

Omawiany podręcznik będzie niewątpliwie wartościową pozycją w bibliotece pracowni wirusologicznych. Może być przydatny również dla biochemików, biologów i biofizyków. Przeszkodą może być to, że został napisany w języku niemieckim, mniej znanym w Polsce niż język angielski.

Jadwiga Koziorowska

http://rcin.org.pl

FEBS ADVANCED COURSES

PROGRAMME 1991

STRUCTURAL AND MOTILE PROTEINS OF THE NUCLEUS AND CYTOPLASM
Lecture Course; 60-80 participants
Winter resort Schladming (Austria);
March 18-22, 1991
Dr. J. V. Small, Austrian Academy of Sciences,
Institute of Molecular Biology, Billrothstr. 11,
A-5020 Salzburg (Austria)
Deadline for applications: December 31, 1990

ONCOGENES AND CELL GROWTH
Lecture Course; 100 participants
Moscow and Kiev, USSR;
June 17-20 and 24-27, 1991
Dr. Inder M. Verma, The Salk Institute,
POB 85800, San Diego, CA 92138 (USA)
Deadline for applications: January 15, 1991

TECHNIQUES IN CELL BIOLOGY
Practical Course; 20 participants
Aarhus University; June 17-26, 1991
Prof. Julio E. Celis, Department of Medical Biochemistry,
Aarhus University, Univ. Park, Ole
Worms Allé, Building 170,
DK-8000 Aarhus C (Denmark)
Deadline for applications: April 1, 1991

THE PLANT VIRUS GENOME: STRUCTURE AND EXPRESSION
Practical and Lecture Course; 50 participants
Jurmala/Riga (Latvia); April 29 - May 5, 1991
Prof. G. Atabekov,
Lab. of Molecular Biology and Bioorganic Chemistry,
Dept. of Virology, Moscow State University,
119899 Moscow, Building A.
Deadline for applications: January 15, 1991

REGULATORY MECHANISMS OF DNA REPLICATION
Lecture Course; 40 participants
Les Arcs, 73700 Bourg Saint Maurice (France);
March 17-23, 1991
Dr. M. Kohiyama, Institut Jaques Monod,
Université Paris VII, 2, Place Jussieu,
75251 Paris Cedes 05

APPLICATIONS OF DNA METHODS FOR THE DIAGNOSIS OF HUMAN DISEASES
Practical and Lecture Course; 15 and 50 participants
Laboratory of Biology and Hotel Porto Rio,
Patras (Greece); May 9-19, 1991.
Professor Aglaia Athanassiadou,
Lab. of Biology, Faculty of Medicine,
University of Patras, 261 10 Patras, Greece
Deadline for applications: March 15, 1991

PRACTICAL ASPECTS ON MEMBRANE PROTEINS
Practical Course; 20 participants
Biochimie, Bat. 432, Université Paris Sud;
June 30 - July 6, 1991
Dr. Marc le Maire,
Centre de Genetique Moleculaire,
C.N.R.S., 91 198 Gif-sur-Yvette Cedex, France.
Deadline for applications: May 1, 1991

ADVANCED METHODOLOGIES FOR THE STRUCTURAL AND FUNCTIONAL ANALYSIS OF PROTEINS
Practical and Lecture Course;
15 and 70 participants
Campus Bellaterra, Barcelona (Spain);
April 22-25, 1991.
Dr. F. X. Avilès, Institute of Fundamental Biology,
Autonomous University of Barcelona,
E-08193 Bellaterra (Barcelona), Spain
Deadline for applications: February 15, 1991

DYNAMICS OF MEMBRANE ASSEMBLY
Lecture Course; 65 participants
Cargèse (Corsica); June 17 - 29, 1991
Prof. J. A. F. Op den Kamp,
Centrum voor Biomembranen en Lipide Enzymologie,
Postbus 80.054, NL-3508 TB Utrecht (The Netherlands).
Deadline for applications: February 1, 1991

REGULATION OF CHLOROPLAST BIOGENESIS
Lecture Course; 150 participants
Aghia Pelagia, Crete; July 18 - August 2, 1991
Prof. J. H. Argyroudi-Akoyunoglou,
Institute of Biology,
NRCPS „Demokritos" - 153 10 Aghia
Paraskevi, Athens (Greece)

MICROBIAL BREEDING
Lecture Course; 60 participants
Dubrovnik-Interuniversity Centre;
October 14 - 21, 1991
Dr. Marija Alačević, University of Zagreb,
Lab. of Biology and Microbial Genetics,
41 000 Zagreb, Krsnjavoga 25 (Yugoslavia)

MODERN METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY
Practical and Lecture Course; 25 participants
late Sept.-early Oct., 1991 (8 days).
Dr. J. Weiser, Institute of Microbiology,
Czechoslovak Academy of Sciences, Videnska 1083.
142 20 Praha 4 (Czechoslovakia)

PROTEIN PHOSPHATASES
Lecture Course; 80 participants
Campus Gasthuisberg; August 25 - 29, 1991
Prof. W. Merlevede,
Katholieke Universiteit te Leuven,
Afdeling Biochemie, Campus
Gasthuisberg, B-3000 Leuven (Belgium).
Deadline for applications: May 1, 1991

CRYSTAL GROWTH OF BIOLOGICAL MACROMOLECULES
Lecture Course; 80 participants
Universität Freiburg; August 18 - 24, 1991
PD Dr. Walter Littke,
Chem. Laboratorium der Universität Freiburg,
Albert-Straße 21, D-7800 Freiburg/FRG.
Deadline of applications: April 15, 1991

EXTREMES OF THE GENETIC CODE
Lecture Course; 70 participants
Spetsai, Greece; Sept. 2 - 9, 1991
Prof. Julian Davies,
Institut Pasteur, Dept. Biotechnologies;
25, rue du Dr. Roux, 75724 Paris Cedes 15, France
Deadline for applications: May 1, 1991

http://rcin.org.pl

KOMUNIKAT KOMISJI SŁOWNICTWA BIOCHEMICZNEGO

W piśmiennictwie pojawia się stale wiele nowych nazw i pojęć. Skłoniło to Komisję Słownictwa Biochemicznego do przygotowania „Leksykonu nowych terminów biochemicznych", w których obok nazw polskich podaje się oryginalne terminy w brzmieniu angielskim, definicję oraz odnośniki do piśmiennictwa. Taki leksykon ukazuje się systematycznie w „Biochemical Education" i jest bardzo pomocny w opracowaniu słownika polskiego. Definicje haseł noszą niejednokrotnie charakter roboczy. Wydaje się jednak pożyteczne opublikowanie Leksykonu w obecnej formie, przewidując możliwe uzupełnienia i korekty. Zachęcamy Czytelników do udziału w kompletowaniu naszego Leksykonu przez proponowanie haseł z własnej dziedziny badań.

Pierwsza część Leksykonu obejmująca hasła od litery **a** do **l**, ukaże się jako suplement do zeszytu 3–4, tomu 36, 1990.

POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE
Postępy Biochemii
Advances in Biochemistry

ORDER FORM

ISSN 0032-5422

☐ Please enter my subscription for 1991 at: institutional rate US$ 60 or personal rate US$ 30 (including postage and handling)

☐ I enclose my cheque (bank draft) for US$. . . . .

☐ I am interested in receiving further information (a free sample) copy of „Postępy Biochemii"

NAME: .....

ADDRESS: .....

.....

POSTAL CODE: ..... DATE .....

Cheques should be made payable or remittance transferred to:

Polish Biochemical Society
16 Freta Street, 00-227 Warszawa
Bank Handlowy, PBK XIII/O Warszawa
37 00 44 - 1225 - 139 - 11

Send orders to:
Polish Biochemical Society
16 Freta Street
00-227 Warszawa
Poland

Aby zaprenumerować „Postępy Biochemii" w 1991 r. należy wpłacić odpowiednią kwotę na konto bankowe wydawcy (Polskiego Towarzystwa Biochemicznego) za pomocą przekazu zamieszczonego na odwrocie. Zamówione egzemplarze będziemy wysyłać pocztą na adres podany nam na przekazie. Ponieważ odcinek przekazu docierający do nas jest jednocześnie zamówieniem, prosimy o **bardzo wyraźne** napisanie imienia, nazwiska (lub nazwy instytucji) i dokładnego adresu razem z kodem pocztowym (DRUKOWANYMI LITERAMI) na wszystkich trzech odcinkach przekazu.

Prenumerata krajowa dla instytucji: 180 000 zł.

Prenumerata krajowa indywidualna: 80 000 zł; (50% zniżki dla członków Polskiego Towarzystwa Biochemicznego).

Prenumerując „Postępy Biochemii" wspierasz swoje czasopismo!

http://rcin.org.pl

EUROPEAN TISSUE CULTURE SOCIETY

39th Annual Meeting
Kraków 16–19 September 1991

Location:
Academy of Physical Education,
Kraków, Al. Planu 6-letniego 62a.

Further information:

Dr M. Słomczynska (Secretary)
Jagiellonian University
Institute of Zoology
Karasia 6
P1-30-060 Kraków,
POLAND

Telephone: 48-12 336377 ext. 445
Fax: 48-12-340785
Tlx: 032-22-97 uj pl

A number of Luciano Morasca awards are avaiable to cover travel and all expenses for young ETCS members.
Apply early to the following address:

Dr. C. Wigley (ETCS Secretary)
Davision of Anatomy and Cell Biology
UMDS (Guys Campus)
London Bridge, London SE1 9RT

Telephone: 071-955 4410
Fax: 071-357-7563
(Attention: Dr Wigley,
Anatomy Department)

Please contact the Editors if you wish to advertise in „Postępy Biochemii" the products and services related to biochemistry, molecular biology and cell biology.

KOMUNIKAT

IX Europejski Kongres Chemii Klinicznej odbędzie się w Polsce, w Krakowie w dniach od 8 do 14 września 1991 roku

Zainteresowani, którzy zgłoszą zamiar udziału w Kongresie otrzymają od Organizatorów formularz rejestracyjny oraz szczegółowe informacje.

Zamiar udziału należy zgłosić na adres:
Komitet Organizacyjny IX Europejskiego Kongresu Chemii Klinicznej
31-501 Kraków
ul. Kopernika 15
telefon: 21-38-76, telex: 326269 KDB PL,
telefax: 21-97-86

Program naukowy Kongresu przewiduje 17 sympozjów w takich tematach jak: lipidy, lipoproteiny, ściana naczynia, krwinki i miażdżyca, chemia kliniczna w gastrologii, cukrzyca, enzymologia kliniczna, białka, onkologia, gospodarka wodno-elektrolitowa, immunologia kliniczna i AIDS, wrodzone defekty metaboliczne, medycyna prewencyjna, porównawcza chemia kliniczna, kontrola jakości, szybkie testy diagnostyczne, krzepnięcie i fibrynoliza, przyszłość chemii klinicznej, nauczanie biochemii a ponadto takie tematy jak: metody analityczne, bakteriologia, chemia kliniczna w epidemiologii, monitorowanie stężenia leków, endokrynologia, biochemia pediatryczna, pierwiastki śladowe, witaminy.

KOMITET ORGANIZACYJNY

Wydawca prosi o kontakt tych, którzy chcieliby wykorzystać łamy „Postępów Biochemii" do reklamowania swych produktów i usług związanych z biochemią, biologią molekularną i biologią komórki.

Pokwitowanie dla wpłacającego	Odcinek dla posiadacza rachunku	Odcinek dla poczty lub banku
zł	zł	zł .....
słownie	słownie	słownie .....
wpłacający	wpłacający	wpłacający .....
imię, nazwisko, dokładny adres z kodem pocztowym	imię, nazwisko, dokładny adres z kodem pocztowym	imię, nazwisko, dokładny adres z kodem pocztowym
na rachunek	na rachunek	na rachunek
Polskie Towarzystwo Biochemiczne 00-227 Warszawa, ul. Freta 16 P.B.K. XIII/O W-wa, Al. Jerozolimskie 37 00 44-1225-139-11	Polskie Towarzystwo Biochemiczne 00-227 Warszawa, ul. Freta 16 P.B.K. XIII/O W-wa, Al. Jerozolimskie 37 00 44-1225-139-11	Polskie Towarzystwo Biochemiczne 00-227 Warszawa, ul. Freta 16 P.B.K. XIII/O W-wa, Al. Jerozolimskie 37 00 44-1225-139-11
stempel	stempel	stempel
Pobrano opłatę zł.	Pobrano opłatę zł.	Pobrano opłatę zł. .....
podpis przyjmującego	podpis przyjmującego	podpis przyjmującego

http://rcin.org.pl

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 równoznaczne z oświadczeniem, że nadesłana praca nie była i nie będzie publikowana w innym czasopiśmie, jeżeli zostanie ogłoszona w „Postępach Biochemii". Autorów obowiązuje korekta autorska szpalt po wstępnym złożeniu (ze względu na opóźnienia publikacji tomu 36 korekta zostanie zrobiona przez zespół Redakcji). W przypadku, gdy Autor(zy) zamierza(ją) włączyć do swego artykułu ilustracje publikowane przez autorów prac cytowanych, należy uzyskać i przekazać nam odpowiednią zgodę na przedruk.

Redakcja prosi Autorów o przestrzeganie następujących wskazówek szczegółowych:

TEKST: Maszynopis powinien być napisany jdnostronnie, czcionką wielkości standardowej, z podwójną interlinią, z lewym marginesem ok. 4 cm z trzydziestoma wierszami na stronie i 60 znakami w wierszu (litery + odstęp), odstępy pomiędzy wyrazami powinny odpowiadać jednemu znakowi (nie równać do prawego marginesu). 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, poczynając od tomu 36 (1991) będą 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-Holland, Amsterdam
3. Norbeth 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 29B. Elsevier, North-Holland Amsterdam, str 1-77
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 należy 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, PAN
ul. Pasteura 3,
02-093 Warszawa

XXVII Zjazd Polskiego Towarzystwa Biochemicznego

odbędzie się w dniach 18-20 września 1991 roku

W programie naukowym Zjazdu przewidujemy referaty plenarne i sympozjalne wygłoszone przez zaproszonych gości oraz prezentację doniesień w następujących sympozjach tematycznych:

1. Molekularna regulacja procesów wzrostu i różnicowania komórek somatycznych — organizuje prof. dr hab. Danuta Rożynkowa,
2. Procesy biotechnologiczne w produkcji żywności i ochronie środowiska — organizuje prof. dr hab. Andrzej Leonowicz,
3. Toksyczne oddziaływanie czynników środowiska na organizmy żywe — organizuje doc. dr hab. Zofia Tynecka,
4. t-RNA i syntetazy aminoacylo-t RNA — organizuje prof. dr hab. Tomasz Borkowski.

Zapraszamy do udziału w Zjeździe i towarzyszących imprezach (spotkanie towarzyskie i wycieczki) członków i sympatyków Polskiego Towarzystwa Biochemicznego.

Do zobaczenia w Lublinie

Komitet Organizacyjny Zjazdu
Zakład Chemii Fizj. AM,
ul. Lubartowska 85 20-123 Lublin
tel. 77-49-48

http://rcin.org.pl

Place your advertisement in „Postępy Biochemii"!

It will reach
many Polish biochemists,
molecular biologists
and medical doctors.

Looking for a post-doctoral fellow?
Looking for a job?
We will publish
your advertisement!
(Advertisements up to 300 letters
are free in 1991).

Szukasz pracy? Szukasz pracownika?
Zamieścimy Twoje ogłoszenie!
20 pierwszych ogłoszeń do 300 znaków
będzie w 1991 roku bezpłatne.
Dział Ogłoszeń
„Postępów Biochemii"
może pośredniczyć
w wymianie informacji
gdy osoba ogłaszająca się
chce zachować incognito.

http://rcin.org.pl