

POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE

POSTĘPY BIOCHEMII

PL ISSN
0032-5422

Advances in Biochemistry

TOM 49, NR 2, 2003

Degradacja mRNA	58
Mutacje adaptacyjne	68
S-tiolacja białek	77
Polimorfizm genów GST człowieka . .	85
Immunoglobulinopodobne receptory leukocytów	96
Dolichole	107
Rubisko	116

Wskazówki dla Autorów

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

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

Autorzy artykułu odpowiadają za prawidłowość i ścisłość podawanych informacji oraz poprawność cytowanego piśmiennictwa. Ujęcie prac winno być syntetyczne, a przedstawione zagadnienia zilustrowane za pomocą tabel, rycin: wykresy, schematy, reakcje, wzory i fotografie.

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

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

Redakcja prosi Autorów o przestrzeganie następujących wskazówek szczegółowych:

TEKST: prosimy o nadsyłanie dwóch egzemplarzy wydruku oraz dyskietki z tekstem zapisanym jako *.doc w formacie IBM PC. Wydruk powinien być jednostronny z lewym marginesem około 4 cm, z zachowaniem podwójnego odstępu między wierszami, z użyciem czcionki Arial CE 11 lub 12. W przypadku stosowania w tekście liter alfabetu greckiego prosimy o wpisanie ółwkiem na marginesie ich fonetycznego brzmienia.

Strona informacyjna jest nienumerowana, zawiera imiona i nazwisko (a) Autora (ów), nazwy, adresy, telefony, adresy e-mail zakładów, w których pracują Autorzy, adres do korespondencji,

tytuł artykułu w języku polskim i angielskim oraz – w prawym dolnym rogu: liczbę tabel, rycin, wzorów i fotografii oraz skrócony tytuł pracy, zamieszczany na okładce czasopisma (do 25 znaków).

Strona 1 (tytułowa) zawiera imiona i nazwiska Autorów, tytuł pracy w języku polskim i angielskim, rzeczowy spis treści też w obu językach, tytuł naukowy każdego z Autorów i ich miejsce pracy z adresem pocztowym i adresem e-mail oraz wykaz stosowanych skrótów w porządku alfabetycznym.

Kolejno numerowane dalsze strony obejmują tekst pracy, piśmiennictwo, tabele, podpisy i objaśnienia rycin, wzorów i fotografii.

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

1. Hildebrandt GR, Aronson NN (1980) *Biochim Biophys Acta* 631: 499-502
2. Bostock CJ, Summer AT (1978) *The Eucaryotic Chromosome*, Elsevier, North-Holland, Amsterdam
3. Norberth T, Piscator M (1979) W: Friberg L, Nordberg GF Von VB (red) *Handbook on the Toxicology of Metals*. Elsevier, North-Holland, Amsterdam, s. 541-553
4. Deleij J, Kesters K (1975) W: Florkin M, Stotz EH (red) *Comprehensive Biochemistry* 29B. Elsevier, North-Holland, Amsterdam, s. 1-7
5. Franks NP, Lieb WR (1981) W: Knight C G (red) *Research Monographs in Cell and Tissue Physiology*, t. 7. Elsevier, North-Holland, Amsterdam, s. 243-272

ILUSTRACJE: ryciny powinny być zapisane na dyskietce jako: *.tif, lub *.cdr, lub *.psd, lub *.eps. Fotografie czarno-białe (kontrastowe) powinny być wykonane na papierze matowym. Istnieje możliwość wykonania reprodukcji barwnych, ale ich koszty ponoszą Autorzy. Na rycinach nie należy umieszczać opisów słownych, lecz posługiwać się skrótami. Osie wykresów powinny być opatrzone napisem łatwo zrozumiałym. Decyzję o stopniu zmniejszenia ryciny podejmuje wydawca. Ilustracji nie należy włączać w tekst maszynopisu, lecz odpowiednio ponumerować: ryciny noszą cyfry arabskiej, wzory zaś rzymskie. Na marginesie tekstu należy zaznaczyć ółwkiem preferowane miejsce umieszczenia ryciny czy wzoru. Słowne objaśnienia znaków graficznych można umieścić w podpisie pod ryciną, rysunkowe zaś jedynie na planszy ryciny. Tytuły i objaśnienia rycin sporządza się w postaci oddzielnego wykazu. Wydruki ilustracji należy na odwrocie podpisać imieniem i nazwiskiem pierwszego z Autorów i pierwszym słowem tytułu pracy oraz oznaczyć „górną-dół” (ółwkiem, na odwrocie). Ze względu na wewnętrzną spójność artykułu wskazane jest konstruowanie oryginalnych rycin i zbiorczych tabel na podstawie danych z piśmiennictwa.

Wydruk i załączniki (w dwu egzemplarzach) oraz dyskietkę, właściwie zabezpieczone przed uszkodzeniem w czasie transportu, prosimy przesłać na adres:

Redakcja kwartalnika „Postępy Biochemii”
Polskie Towarzystwo Biochemiczne
ul. Pasteura 3
02-093 Warszawa

WYDAWCA

Editor
POLSKIE TOWARZYSTWO
BIOCHEMICZNE
Polish Biochemical Society
ul. Pasteura 3,
02-093 Warszawa, Poland
tel/fax 658-20-99
e-mail — ptbioch@nencki.gov.pl
www.ptbioch.edu.pl

REDAKTOR SENIOR

Senior Editor
ZOFIA ZIELIŃSKA
tel. 831-24-03

REDAKTOR NACZELNY

Editor in chief
GRAŻYNA PALAMARCZYK
tel. 658-47-02

REDAKTORZY

Editors
KRYSTYNA GRZELAK
DANUTA HULANICKA
ANDRZEJ JERZMANOWSKI
ANDRZEJ KASPRZAK
LILIANA KONARSKA
ANNA SZAKIEL
ADAM SZEWCZYK

BIURO REDAKCJI

Editorial office
SEKRETARZ
Secretary
HANNA LASKOWSKA
poniedziałki, czwartki
monday—thursday
14—16
tel. 659-85-71 w. 441
SKŁAD I ŁAMANIE
Typesetting & Layout
MAŁGORZATA BASAJ

RECENZENCI ZESZYTU

Referees of this issue
EWA BARTNIK (Warszawa)
WITOLD JACHYMCZYK
(Warszawa)
ELŻBIETA ROMANOWSKA
(Warszawa)
RYSZARD SŁOMSKI (Poznań)
KATARZYNA WINIARSKA
(Warszawa)

ADRES REDAKCJI

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

Kwartalnik „Postępy Biochemii” wydawany z
pomocą finansową Komitetu Badań Naukowych
Indeksowany w Medline i Agrolibrex

SPIS TREŚCI

CONTENTS

Mechanizmy degradacji mRNA

Various mechanisms of mRNA degradation
MICHAŁ MAŁECKI, PIOTR P. STĘPIEŃ 58

Mutacje adaptacyjne

Adaptive mutations
ANETTA NOWOSIELSKA, ELŻBIETA GRZESIUŁ 68

S-tiolacja białek jako mechanizm antyoksydacyjny i regulacyjny

Protein S-thiolation as an antioxidative and regulatory
mechanism
LIDIA WŁODEK, MAŁGORZATA ICIEK 77

Znaczenie polimorfizmów genów transferaz glutationowych człowieka

The significance of polymorphisms in the human glutathione
transferase genes
CHRISTOS KARGAS, ZOFIA WALTER 85

Charakterystyka immunoglobulinopodobnych receptorów leu- kocytów — ILT

The characteristics of ILT receptors
ANDRZEJ WIŚNIEWSKI 96

Dolichole, długotańcuchowe lipidy izoprenoidowe biorące udział w modyfikacjach białek

Dolichols, long-chain isoprenoid lipids required for protein modi-
fication
GRAŻYNA SOSIŃSKA 107

Charakterystyka karboksygenazy-oksygenazy rybulo- zo-1,5-bisfosforanu (rubisko). Kierunki badań

Characterisation of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxy-
genase (rubisco). Direction of studies
RAFAŁ BARTOSZEWSKI, IZABELA ŁACZMAŃSKA, JAROSŁAW
KRÓLICEWSKI, ANDRZEJ SZCZEPANIAK 116

Mechanizmy degradacji mRNA

Various mechanisms of mRNA degradation

MICHAŁ MAŁECKI¹, PIOTR P. STĘPIEŃ^{1,2}

Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Degradacja mRNA u bakterii
- III. Degradacja mRNA u *Eukaryota*
- IV. Degradacja mRNA w chloroplastach
- V. Degradacja mRNA w mitochondriach drożdży
- VI. Degradacja mRNA w mitochondriach roślin

Contents:

- I. Introduction
- II. mRNA degradation in bacteria
- III. mRNA degradation in Eucariota
- IV. mRNA degradation in chloroplasts
- V. mRNA degradation in yeast mitochondria
- VI. mRNA degradation in plant mitochondria

Wykaz stosowanych skrótów: A — nukleotyd adeninowy; mRNA- matrycowe RNA; PAP — poli(A) polimeraza; PNPaza — fosforylaza polinukleotydowa; RNaza — rybonukleaza RNA; tRNA — transporterowe RNA; UTR — region nie podlegający translacji

I. Wstęp

Ekspresja genów organizmów żywych regulowana jest głównie na etapach transkrypcji, stabilności mRNA i translacji. Stężenie poszczególnych transkryptów jest wypadkową wydajności ich syntezy i szybkości z jaką są degradowane. Degradacja jest niezbędna nie tylko przy usuwaniu w odpowiednim czasie mRNA, które przestają być komórce potrzebne, ale również trawieniu elementów takich jak introiny, czy przedłużone odcinki UTR wycinane z pre-mRNA podczas dojrzewania. Nieprawidłowo procesowane cząsteczki mRNA są też degradowane co zapobiega powstawaniu niefunkcjonalnych białek. O niezwyklej wadze procesu degradacji mRNA w organizmach żywych świadczy fakt, że we wszystkich po-

znanych dotychczas systemach mutacje w głównych genach odpowiadających za degradację okazywały się letalne.

Degradacja jako proces tak istotny dla życia komórki musi podlegać bardzo restrykcyjnej regulacji. Poznane dotychczas systemy ujawniły, że regulacja rozkładu RNA zachodzi na wszystkich etapach jego istnienia, od transkrypcji do translacji. Cząsteczki RNA zaopatrzone są w odpowiednie sygnały regulujące ich czas półtrwania w komórce, mogą to być struktury znajdujące się na końcach 3' lub 5', jak ogony poli(A) czy struktury drugorzędowe, bądź też odpowiednie sekwencje zawarte w obrębie otwartej ramki odczytu.

W większości systemów swoistymi egzekutorami kontrolującymi rozkład określonych cząsteczek są skomplikowane kompleksy enzymatyczne. Kompleksy takie łącząc kilka funkcji istotnych dla degradacji zapewniają ich wzajemną koordynację i wspólną regulację.

II. Degradacja mRNA u bakterii

Degradacja mRNA najlepiej poznana jest u bakterii *E. coli*. Inicjowana jest przez jedno lub kilka endoribonukleolitycznych cięć, których produkty degradowane są przez egzonukleazy w kierunku od 3' do 5' [1].

¹Student IV roku biologii UW, ²prof. dr hab.; ¹Zakład Genetyki Uniwersytetu Warszawskiego, ul. Pawińskiego 5A, 02-106 Warszawa; ²Instytut Biochemii i Biofizyki Polskiej Akademii Nauk, ul. Pawińskiego 5A, 02-106 Warszawa; tel. 659-7072 wew. 2240

Kluczowym enzymem w degradacji mRNA u bakterii jest endorybonukleaza E, zaangażowana również w procesowanie 5S rRNA i degradację rRNA [2]. RNaza E, kilkudomenowe białko (1061 aminokwasów), jest endonukleazą specyficzną dla obszarów jednoniciowych, nie wykazuje silnej specyficzności wobec określonych sekwencji, ale jej miejsca cięcia często znajdują się w rejonach bogatych w AU. Dodatkowo jej aktywność zależy od obecności wolnego końca 5' [3]. Wykazano *in vitro*, że koliste RNA oraz substraty, których koniec 5' zawiera strukturę drugorzędową, pomimo obecności dobrze scharakteryzowanych miejsc cięcia są odporne na działanie RNazy E. RNA zawierające na końcu 5' monofosforany są bardziej preferowane przez endonukleazę E niż RNA z trifosforanami [3, 4]. Struktury pojawiające się na końcach 5' mRNA mogą więc wpływać na czas istnienia danej cząsteczki w komórce bakterii. Mutacja w genie kodującym endonukleazę E jest letalna, co wskazuje na jej kluczową funkcję spośród endonukleaz zaangażowanych w degradację mRNA. Wykazano też, że do przeżycia komórki niezbędne jest ok. 60% N-końcowej części białka [5].

Trzy z zaangażowanych w degradację egzonukleaz to RNaza II, PNP-aza i oligorybonukleaza. RNaza II jest enzymem hydrolitycznym, produktami katalizowanej przez nią reakcji są monofosforany nukleotydów. PNP-aza to enzym fosforolityczny rozkładający RNA do difosforanów nukleotydów [6]. Funkcje obu enzymów częściowo na siebie zachodzą, inaktywacja któregoś z nich nie jest letalna w odróżnieniu od inaktywacji obu [7].

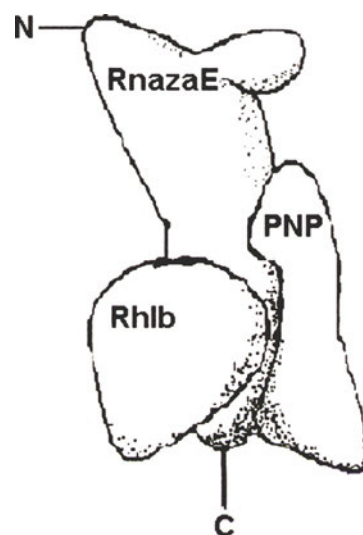
PNP-aza i RNaza II nie są w stanie degradować obszarów na których znajdują się struktury II rzędowe. Tymczasem struktury takie bardzo często znajdowane są na 3' końcach mRNA np. rho-niezależnych terminatorów [8] produktów procesowania przez RNazę III czy w mRNA zawierających sekwencje REP [9]. Dlatego musiały rozwinąć się dodatkowe mechanizmy pozwalające egzonukleazom na przejście przez stabilne II rzędowe struktury.

Trzecia z egzonukleaz to oligorybonukleaza, degraduje ona krótkie oligonukleotydy (4-5 pz) które pozostają po działalności PNPazy i RNazy II [10]. Jest jedyną egzonukleazą, której funkcji nie mogą zastąpić inne.

Jednym z kluczowych odkryć ostatniej dekady było wykazanie, że enzymy *E. coli* odpowiadające za degradację RNA, wraz z innymi białkami tworzą duży kompleks zwany degradosomem (Ryc. 1) [11-13]. Przy próbach oczyszczenia RNazy E zauważono, że wraz z nią w otrzymanej frakcji znajduje się PNPaza i kilka innych białek [12], podobne wyniki

otrzymano przy oczyszczaniu PNPazy. Po zsekwencjonowaniu N-końcowych części otrzymanych białek udało się zidentyfikować składniki degradosomu. Prócz RNazy E i PNPazy zawiera on też enolazę i ATP-zależną helikazę Rhlb [13]. W mniejszych ilościach z degradosomem koimmunoprecypitują też czaperoniny Gro EL i DnaK oraz kinaza polifosforanowa. Jednak ewentualna funkcja tych białek w degradacji mRNA nie została dotychczas ustalona.

Znalezienie PNPazy, RNazy E i Rhlb helikazy w jednym kompleksie sugeruje, że degradosom koordynuje zdarzenia egzo- i endonukleolityczne. Helikaza w tym kompleksie może wykorzystując energię ATP rozplatać struktury drugorzędowe, lub usuwać białka związane z RNA. Inaktywacja tego enzymu jest w pewnych warunkach letalna [14].



Ryc. 1. Hipotetyczna budowa degradosomu bakteryjnego.

RNaza E stanowi szkielet degradosomu. N-końcowa domena jest odpowiedzialna za aktywność katalityczną białka, C-końcowa część stanowi rusztowanie do którego asocjują inne białka kompleksu [15, 16]. Analizy wykonane za pomocą mikroskopii elektronowej wykazały, że degradosom jest przytwierdzony do wewnętrznej błony komórkowej poprzez N-końcową domenę endorybonukleazy E [17].

Prócz aktywności helikazowej u bakterii wykształcił się inny mechanizm wspomagający degradację II rzędowych struktur RNA. Polimeraza poli(A) u *E. coli* (PAPI) została opisana o wiele wcześniej, ale dopiero poznanie genu kodującego ją pozwoliło na dalsze ważne odkrycia [18]. Mutacja w genie PAPI nie jest letalna, ale powoduje wydłużenie czasu półtrwania niestabilnych klas RNA. U bakterii więc, w odróżnieniu od organizmów eukariotycznych, poliadenylacja destabilizuje cząsteczki RNA [19].

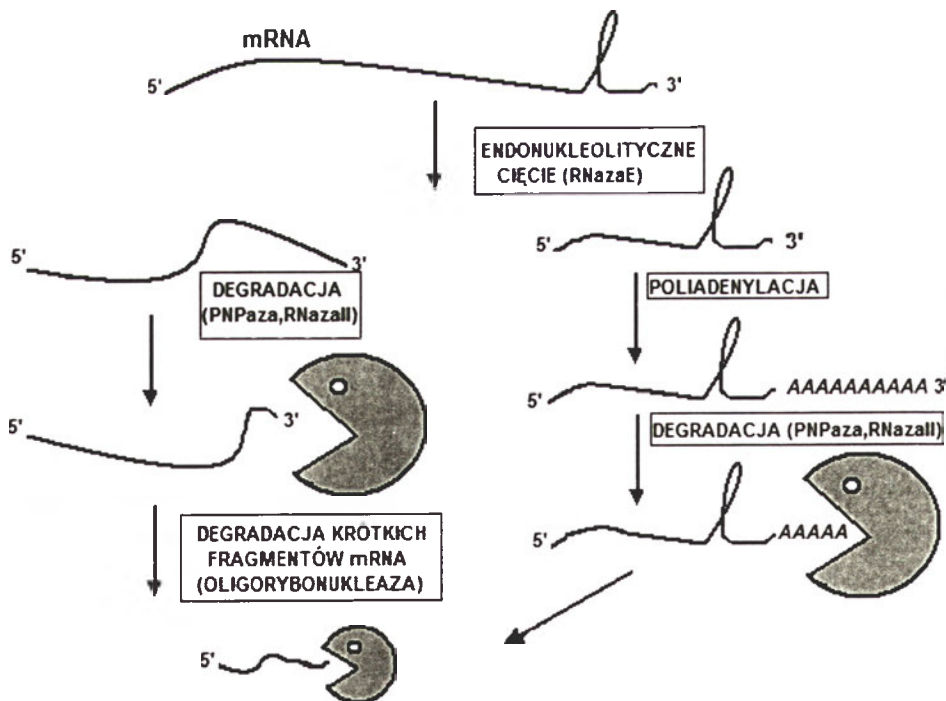
Badania *in vitro* wykazały, że poliadenylacja wspomaga degradację obszarów dwuniciowych RNA [11, 20, 21]. Gdy na końcu 3' cząsteczki RNA znajduje się struktura drugorzędowa, degradosom oraz egzonukleazy nie mają do niej dostępu. Dosyntetyzowanie ogona poli(A) zwiększa powinowactwo degradosomu do substratu i pozwala na jego degradację. Ogony poli(A) znajdowano w różnych rodzajach mRNA [19] a także na końcach 3' produktów cięcia RNazyE [22].

Inaczej niż u *Eukaryota* miejsca determinujące dodawanie ogonów poli(A) przez PAPI nie wykazują jakiejś specyficznej sekwencji, jednak nie są one losowo rozłożone na RNA i grupują się w określonych miejscach [18, 19, 22]. Sugeruje to, że nawet po dosyntetyzowaniu poli(A) przejście egzonukleaz przez drugorzędowe struktury RNA nie jest przesądzone i proces może przebiegać w kilku powtarzających się rundach poliadenylacji i degradacji.

Poliadenylacja wydaje się być czynnikiem inicjującym degradację niektórych klas RNA. Przykładem mogą być RNA pozbawione miejsc cięcia dla endonukleazy E np. RNAT faga f1 [23], RNA-OUT [24] a także produkty pośrednie zawierające drugorzędowe struktury, a uwolnione przez degradosom przed całkowitym rozkładem.

pierwsze cięcie przeprowadzane przez rybonukleazę E lub dosyntetyzowanie ogona poli(A) zależnie od substratu. Po rozpoczęciu degradacji PNPaza lub Rnaza II egzonukleolitycznie trawią mRNA. Helikaza Rhlb i dalsze rundy poliadenylacji wspomagają degradację dwuniciowych obszarów RNA. Krótkie oligonukleotydy RNA są na końcu rozkładane przez oligorybonukleazę.

Pomimo że proces degradacji mRNA u bakterii wydaje się być najlepiej poznany, nadal jest wiele znaków zapytania. Nie udało się ustalić stechiometrycznej budowy degradosomu, nie wiemy czy jest kompleksem statycznym czy mobilnym, zmieniającym swój skład zależnie od substratu czy pojawiających się metabolitów. Do tej pory nie stwierdzono obecności w degradosomie dwóch podstawowych enzymów degradacji RNA – RNazy II i PAPI, choć wykryto, że przy degradacji specyficznych RNA poli(A) polimeraza (PAPI) może asocjować z RNazą E [25]. Nie wiemy, jak wygląda współpraca między enzymami zaangażowanymi w degradację, których funkcje na siebie zachodzą np. PNPazą i RNazą II czy aktywność Rhlb helikazy i poliadenylacja. Te i wiele innych pytań czekają nadal na rozwiązania, które ostatecznie wyjaśnią problem degradacji RNA u bakterii.



Ryc. 2. Degradacja mRNA u bakterii.

W świetle przeprowadzonych do tej pory doświadczeń można było stworzyć hipotetyczny model degradacji mRNA u bakterii (Ryc. 2). Czynnikiem limitującym rozpoczęcie degradacji jest

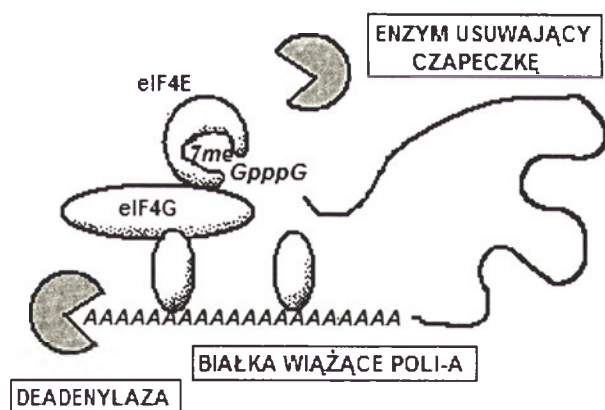
III. Degradacja mRNA u *Eukaryota*

Aby rozpatrywać problem degradacji mRNA w organellach komórkowych należy najpierw przeana-

lizować ten proces w komórkach eukariotycznych. Wiele danych na ten temat otrzymano badając degradację mRNA u drożdży *S. cerevisiae*. Co prawda nie udało się jak dotąd zrekonstruować tego procesu *in vitro*, ale wykazano aktywność poszczególnych enzymów.

Stwierdzono, że deadenylacja jest czynnikiem wymaganym do rozpoczęcia degradacji mRNA. Mutacje powodujące zmniejszenie lub wzrost tempa deadenylacji odpowiednio zmieniają czas, w którym transkrypty zaczynają być degradowane [26-28]. Degradacja może się rozpocząć, gdy ogon poli(A) zostanie skrócony do około 10-12 reszt [27]. U ssaków długość poli(A), przy której może być zainicjowany rozkład, waha się od 25 do około 60 nukleotydów [26, 28].

Wykazano, że mRNA u *Eukaryota* w wyniku oddziaływania białek wiążących się z łańcuchem poli(A) z czynnikami translacyjnymi eIF4 na końcu 5' ma strukturę kolistą [29]. Dzięki temu ogon poli(A) jest chroniony przed egzonukleolityczną degradacją a czapeczka guanozynowa przed kompleksem, który ją usuwa [30]. Deadenylacja substratu pozwala na odcięcie czapeczki, co udostępnia transkrypt egzonukleazom trawiącym go w kierunku od 5' do 3' (Ryc. 3).



Ryc. 3. Model oddziaływań czynników inicjacji translacji u *Eukaryota*.

Znaleziono dwa kompleksy białkowe biorące udział w deadenylacji. Pierwszy zlokalizowany w jądrze, drugi w cytoplazmie, uważany za główny kompleks odpowiedzialny za deadenylację mRNA [31]. Usunięcie czapeczki umożliwia rozkład RNA od końca 5'. Enzymy odpowiedzialne za oba te procesy znaleziono w jednym kompleksie. Główne białka tego procesu to heptamer Lsm, enzym usuwający czapeczkę Dcp-1, 5'-3' egzonukleaza Xrn-1 oraz białko Pat1 [32, 33].

Drugą drogą degradacji mRNA u drożdży jest rozkład egzonukleolityczny w kierunku od 3' do 5'. Głównym motorem poszukiwania tej ścieżki degradacji był fakt, że szczepy z zablokowanym systemem rozkładu od końca 5' są zdolne do życia, a badane mRNA tych szczepów nadal jest degradowane, tyle, że w wolniejszym tempie. Pierwszym dowodem na istnienie aktywności egzonukleolitycznej 3'-5' były wyniki degradacji mRNA drożdżowego genu PGK1 przy zablokowanym systemie 5'-3' [34]. W doświadczeniu użyto metody polegającej na insercji w obręb genu odcinka poli(G), który stanowi przeszkodę dla egzonukleaz trawiących RNA [27]. Analiza intermediatów wskazywała na zachodzącą degradację od końca 3' do 5'. Ostatecznie hipotezę, że ścieżka 3'-5' jest drugą drogą rozkładu mRNA u drożdży potwierdziło doświadczenie, w którym każda para pojedynczych mutacji, z których jedna blokowała system degradacji od końca 5', a druga od 3', okazała się letalna (Ryc. 4) [35].

Za degradację RNA od końca 3' odpowiadają dwa kompleksy białkowe: egzozom, oraz kompleks trzech białek Ski2, Ski3 i Ski8 [35]. Kompleksy te połączone są ze sobą za pośrednictwem potencjalnej GTP-azy Ski7. Jądrowa forma egzozomu zbudowana jest z jedenastu komponentów, z których wszystkie prócz Csl4p wykazują *in vitro*, lub na zasadzie homologii przyporządkowane są, do aktywności egzorybonukleolitycznej w kierunku od 3'-5' [36]. Wydaje się, że egzozom jako zbiór egzonukleaz zapewnia procesywność degradacji, świadczą o tym częściowo zdegradowane od 3' końca intermediaty otrzymane w szczepach z mutacją w którymś z białek egzozomu [35].

Podsumowując: główne drogi degradacji mRNA występujące u drożdży to rozkład od końca 5', poprzedzony usunięciem czapeczki, lub degradacja od końca 3'. Rozpoczęcie obu tych procesów jest limitowane przez deadenylację (Ryc. 4). Choć w pierwszej kolejności rozpoczyna się rozkład od końca 5', wykazano, że w komórkach mogą one przebiegać równocześnie, a w przypadku niektórych transkryptów preferowana jest nawet droga degradacji od końca 3' [35]. Wydaje się, że mechanizmy te są częściowo wymienne, zależnie od czynników wpływających na komórkę [34]. Te dwie drogi są prawdopodobnie uniwersalne w obrębie *Eukaryota*. Taką hipotezę potwierdza fakt znalezienia homologów białek odpowiadających za degradację mRNA u drożdży, m. in. produktów genów XRN1, SKI6/RRP41, SKI2 i RRP4 w komórkach innych *Eukaryota*, także ssaków. Dodatkowo znaleziono homolog egzozomu za-

równy w jądrze jak i w cytoplazmie komórek ssaczych [37].

W komórce jest jeszcze dodatkowy system degradacji mRNA, który zapewnia szybki rozkład nieprawidłowych cząsteczek (ang. *nonsense mediated decay*). Przykładem jest degradacja mRNA genu PGK1 pozbawionego kodonu terminacji translacji, która zachodzi bez enzymów odpowiadających za deadenylację, odcięcie czapeczki i degradację od końca 5' [38]. Najnowsze badania wykazały, że za proces ten

ności mRNA. Podobnie jak u bakterii większość chloroplastowych mRNA zawiera na końcu 3' odwrócone powtarzające się sekwencje, które tworzą w komórce stabilne struktury drugorzędowe [9]. Inaczej niż w przypadku jądrowego mRNA w chloroplastach nie wykazano poliadenylacji dojrzałych transkryptów.

Uważa się, że degradacja mRNA w chloroplastach rozpoczyna się podobnie jak u bakterii od endonukleolitycznego cięcia transkryptu, po którym nastę-



Ryc. 4. Degradacja mRNA u *Eukaryota*.

odpowiada egzosom [39]. Rybosom nie napotykając sygnału terminacji przesuwa się po mRNA aż do końca poli(A) 3', tam w puste miejsce A rybosomu wchodzi białko Ski7, którego N-końcowa domena ma powinowactwo do egzosomu. Po przyłączeniu się do takiego kompleksu egzosom trawi RNA niezależnie od deadenylacji. Podobnie działające systemy degradacji wadliwych mRNA usuwają też cząsteczki z niewyciętymi intronami [40], nie przyciętym 3'-UTR [41] czy przedwczesnym kodonem terminacji translacji, pojawiają się one też u innych *Eukaryota*. Degradację może też rozpoczynać endonukleolityczne cięcie w obrębie mRNA [42, 43]. Istnienie takiej drogi rozpoczęcia degradacji niektórych transkryptów sugeruje możliwość regulacji czasu ich półtrwania przez aktywację określonych endonukleaz lub oddysocjowanie od RNA czynników blokujących miejsce cięcia.

IV. Degradacja mRNA w chloroplastach

Regulacja genomu chloroplastowego zachodzi na wielu poziomach, między innymi na poziomie stabil-

puje poliadenylacja produktów, co kieruje je na drogę natychmiastowej egzonukleolitycznej degradacji [44]. Udowodniono, że zablokowanie poliadenylacji RNA w doświadczeniu badającym degradację RNA w lizacie chloroplastowym daje ten sam efekt co wprowadzenie inhibitora egzonukleaz — drożdżowego tRNA [45]. Degradacja RNA była wstrzymana i następowała akumulacja produktów cięcia przez endonukleazy.

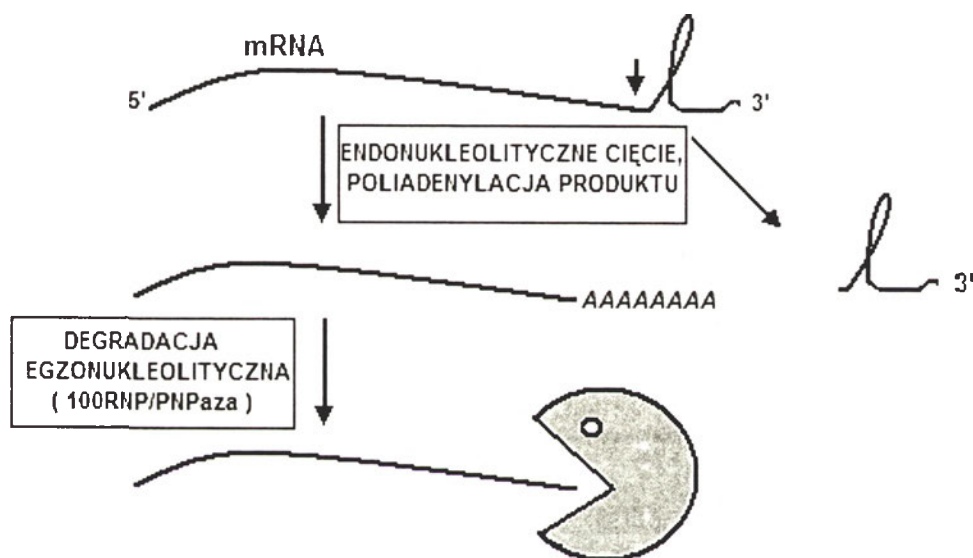
Poliadenylacja całkowitego mRNA wyizolowanego z chloroplastów jest wykrywana na bardzo niskim poziomie. W wyniku szybkiej degradacji transkryptów z dołączonym poli(A) są wysoce niestabilne i wykrycie ich wymagało zastosowania RT PCR. Pozwoliło to na wykrycie poliadenylacji zarówno na dojrzałych transkryptach jak i na produktach cięcia przez endonukleazy [44]. W chloroplastach produkt transkrypcji może albo przekształcić się w dojrzały mRNA, albo być skierowany do natychmiastowej degradacji przez poliadenylację. *In vitro* wybór jednej z tych dwu ścieżek zależy od stężenia ATP [44], jednak o regulacji tego procesu w chloroplastach mogą decydować inne czynniki. RNA zawierające na końcu 3'

struktury drugorzędowe są poliadenylowane z dużo niższą wydajnością niż jednoniciowe końce [44]. Jako, że większość dojrzałych transkryptów zawiera takie struktury na swoich końcach 3' są one stabilne w odróżnieniu od cząstek RNA odrzucanych w trakcie dojrzewania, czy źle obrobionych. Przypuszcza się, że stabilne dojrzałe mRNA kierowane są na drogę degradacji przez endonukleolityczne cięcie pozwalające na poliadenylację nowopowstałego końca 3' (Ryc. 5).

W odróżnieniu od mRNA genów jądrowych czy bakteryjnego, ogony poli(A) genów chloroplastowych nie są homopolimerami. Mogą mieć długość do kilkuset nukleotydów i składają się z grupek adenyzy połączonych głównie guanozynami, rzadziej resztami cytydyny czy urydyny [44].

kazało jednak, że składa się on wyłącznie z PNP-azy, która w chloroplastach asocjuje w homomultimer [48]. PNPazy chloroplastowej nie wykryto też w innych kompleksach białkowych zbliżonych masą do bakteryjnego degradosomu [48]. Drugą cechą różniącą system degradacji mRNA bakteryjnych i chloroplastowych jest brak w chloroplastach poli(A) polimerazy, której funkcję zastępuje PNPaza [50]. Bakteryjna PNPaza również wykazuje aktywność poli(A) polimerazy, ale wydaje się to mieć znaczenie tylko w szczepach pozbawionych oryginalnej polimerazy, która pełni główną funkcję [51].

Wykazano, że bakteryjne szczepy z RNazą E pozbawioną domeny C-końcowej odpowiedzialnej za formowanie się białek degradosomu są zdolne do życia [52, 53]. Wskazuje to, że degradosom nie jest



Ryc. 5. Degradacja mRNA w chloroplastach.

Rybonukleazą zaangażowaną w degradację chloroplastowego RNA jest 100RNP/PNPaza [46]. Oczyszczone 100-kDa białko wykazuje dużą homologię do bakteryjnej PNPazy zarówno biochemicznie jak i na poziomie sekwencji. Chloroplastowa 100RNP/PNPaza także degraduje mRNA od końca 3' i podobnie jak bakteryjna PNPaza może wykazywać aktywność poli(A) polimerazy. Stwierdzono, że enzym ma duże powinowactwo do sekwencji poli(A) [47], dzięki temu poliadenylowane substraty ulegają szybkiej degradacji.

Najnowsze badania wykazały dwie zasadnicze różnice w degradacji mRNA u bakterii i w chloroplastach [48]. Homologia 100RNP/PNP-azy z PNP-azą *E. coli* [49], oraz wyizolowanie jej z chloroplastów w postaci dużego kompleksu białek [46] sugerowało podobieństwo tego kompleksu do bakteryjnego degradosomu. Dokładne oczyszczenie kompleksu wy-

struktura niezbędną w procesie degradacji mRNA co potwierdzają badania przeprowadzone na chloroplastach. Procesy degradacji w bakterii i chloroplastach są jednak w dużej mierze podobne. Różnice mogą wynikać z innego czasu półtrwania transkryptów, u *E. coli* może to być tylko kilka minut [54], w chloroplastach mRNA jest stabilne przez kilka godzin [55]. Potrzeba tak szybkiej degradacji transkryptów u bakterii mogła zaindukować powstanie skomplikowanej sprawnie działającej maszyny jaką jest degradosom, którego chloroplasty po prostu nie potrzebują.

V. Degradacja mRNA w mitochondriach drożdży

Ekspresja mitochondrialnego genomu drożdży kontrolowana jest przez procesy posttranskrypcyjne,

głównie dojrzewanie i degradację RNA [56,57]. Promotory mitochondrialnych genów drożdżowych są bowiem dość prosto zbudowane – zawierają konserwowaną sekwencję 5'-ATATAAGTA-3'. Prócz sekwencji DNA i białek wykazujących powinowactwo do mitochondrialnej polimerazy RNA, niezbędnych do inicjacji transkrypcji w obrębie nonekameronu, nie wykryto innych czynników modyfikujących siłę promotorów mitochondrialnych [56].

Wykazano, że degradacja RNA w mitochondriach drożdżowych prowadzona jest przez wielobiałkowy kompleks zwany degradosomem mitochondrialnym (mtEXO) [58]. *In vitro* kompleks wykazuje aktywność NTP-zależnej egzorybonukleazy trawiącej RNA w kierunku od 3' do 5', jest aktywowany zarówno przez rybonukleotydy jak i deoksyrybonukleotydy. Produktami reakcji egzonukleolitycznej są monofosforany nukleotydów, co wskazuje, że jest to proces hydrolityczny [58]. Brak jest danych na temat roli endonukleaz w degradacji RNA drożdżowego, nie wykryto także poliadenylacji mitochondrialnej.

Ostatnie badania wykazały, że mtEXO składa się z dwóch podjednostek, DSS1 oraz SUV3 (Ryc. 6) [59]. Udało się oczyścić degradosom do homogenności dzięki zastosowaniu metody TAP-tag. Zarówno preparaty otrzymane ze szczepu gdzie sekwencja

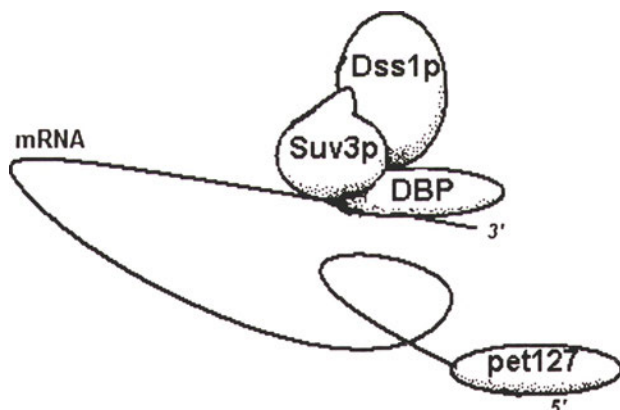
Gen DSS1 został wyizolowany jako wielokopio- wy supresor dysrupcji SUV3 [64]. Koduje on białko o masie 111 kDa zawierające motywy charakterystyczne dla bakteryjnej egzonukleazy II.

Prócz degradosomu w mitochondriach drożdży wykryto jeszcze dwa enzymy o aktywności nukleolitycznej. Pierwszym jest produkt jądrowego genu NUC1. Białko nuc1p ma aktywność RNazy, endonukleazy zarówno jedno- jak i dwuniciowego DNA i egzonukleazy trawiącej dwuniciowe DNA od końca 5' [65]. Drugą aktywność wykazuje produkt genu YNT20 [66], który jest prawdopodobnie odpowiedzialny za trawienie krótkich oligonukleotydów uwalnianych przez degradosom [59]. Wykazano, że oba z tych genów nie są niezbędne do ekspresji mitochondrialnego genomu drożdży co wskazuje, że nie pełnią one głównej funkcji w procesie regulacji stabilności i degradacji mRNA [65, 66].

Aktywność egzorybonukleolityczna degradosomu jest całkowicie zależna od obecności helikazy RNA [59]. U bakterii aktywność helikazy jest niezbędna tylko przy pokonywaniu przez egzonukleazy II-rzędowych struktur [21]. W mitochondriach drożdży trawienie RNA nie nastąpi jeśli nie będzie któregośkolwiek ze składników degradosomu. Prawdopodobnie jest to spowodowane tym, że Dss1p nie zawiera domeny wiążącej RNA i możliwe, że za interakcję z substratem odpowiada suv3p, który równocześnie rozwija napotkane struktury dwuniciowe [59].

Wykazano, że degradosom może asocjować do rybosomów. W preparacie oczyszczonego degradosomu wykryto dodatkowo białko rybosomalne małej i dużej podjednostki [59]. Sugestię tę potwierdziło odwrotne doświadczenie, w którym w preparacie oczyszczonych mitochondrialnych rybosomów wykryto białka degradosomu.

Degradosom mitochondrialny pełni ważną funkcję w usuwaniu niedojrzałego i nieprawidłowo splicowanego mRNA [59]. Wcześniejsze badania sugerowały, że mtEXO bierze udział w degradacji wyciętych intronów, a helikaza suv3 usuwa z nich białka biorące udział w autosplicingu, dzięki czemu w matriksie utrzymywana jest stała ich pula [56]. Potem jednak wykazano, że mutanty w genach SUV3 czy DSS1 których genom mitochondrialny nie zawierał intronów miały też mocno zaburzony metabolizm, co prowadziło do utraty zdolności oddychania, translacja w mitochondriach zostawała przerywana, a genom mitochondrialny był szybko tracony [67]. Najnowsze badania wykazały, że przy braku aktywności degradosomu w szczepach z bezintronowym genomem mitochondrialnym następuje akumulacja



Ryc. 6. Hipotetyczna budowa mtEXO.

TAP-tag była dołączona do DSS1 jak i do SUV3 wykazywały aktywność NTP zależnej 3'-5' egzonukleazy. Analiza na żelu poliakrylamidowym wykazała, że kompleks składa się z dwóch białek o masach odpowiednio 110 i 75 kDa.

Gen SUV3 koduje białko o masie 84 kDa, w którym znaleziono motyw charakterystyczny dla ATP-zależnych helikaz z rodziny DEAD-box [60]. Wykazano, że składnik bakteryjnego degradosomu Rhlb helikaza jest też białkiem należącym do tej rodziny [13]. Znane są też ortologi białka Suv3 w mitochondriach roślin i zwierząt, w tym człowieka [61-63].

prekursorów mRNA i rRNA, ale wykrywana też jest liczna frakcja dojrzałych RNA [59]. Sugeruje to, że degradosom nie jest zaangażowany w procesowanie RNA a raczej w usuwanie niedojrzałych i źle sformowanych cząsteczek. Hipotezę tę potwierdza fakt, że mutacje w każdej z podjednostek degradosomu przywracają ekspresję i stabilizują zmutowane mRNA

wiążącym białka *cis* z końca 5' z elementami mRNA na końcu 3' mogą być białka wiążące się do konserwowanej sekwencji dodekameru znajdującej się na końcach transkryptów mitochondrialnych (ang. *dodecamer binding protein* — DBP) (Ryc. 6) [74,75]. DBP może być zaangażowane w regulację stabilności RNA. Eksperymenty *in vitro* wykazały, że białko

Tabela 1.

Główne czynniki degradacji mRNA u różnych organizmów

	GŁÓWNE ENZYMY	POLIADENYLACJA	CZYNNIK INICJUJĄCY	KIERUNEK DEGRADACJI	OBECNOŚĆ WIELOENZYMATYCZNYCH KONPLEKSÓW
BAKTERIE	rybonukleaza E RNaza II PNP-aza oligorybonukleaza Rh1b helikaza PAP I polimeraza	występuje, homopolimer	endonukleolityczne cięcie i poliadenylacja produktów od 3' końca	3'→5'	degradosom
EUKARYOTA	Lsm deadenylaza Dcp – 1 Xm – 1 pat – 1 egzosom białka Ski	występuje, homopolimer	deadenylacja	5'→3' 3'→5'	egzosom kompleks białek Ski kompleks trawiący mRNA od 5' i usuwający czapkę
CHLOROPLASTY	100RNP/PNPaza	występuje, heteropolimer	endonukleolityczne cięcie i poliadenylacja produktów	3'→5'	homomultimer PNPazy
MITOCHONDRIA DROZDŹY	Suv 3p Dss 1p Ynt 20	nie stwierdzono		3'→5'	mtEXO(degradosom mitochondrialny)
MITOCHONDRIA ROŚLIN	nie oczyszczono	występuje, homopolimer	poliadenylacja?	3'→5'(?)	nie oczyszczono

[68,69]. Dodatkowym argumentem jest asocjacja cząsteczek degradosomu do rybosomów, co przypomina systemy szybkiego usuwania niepożądanych mRNA w cytoplazmie komórek ssaczych [70].

Końce 3' i 5' mitochondrialnego mRNA mogą być fizycznie połączone podobnie jak dzieje się to w mRNA z cytoplazmy komórek *Eukaryota*. Sugeruje to fakt wyselekcjonowania genu PET127 jako wielokopijnego supresora delekcji genów SUV3 lub DSS1[71]. PET127 koduje białko o aktywności RNA-zy zaangażowane w obróbkę 5' końca mitochondrialnego mRNA tym czasem mtEXO działa na 3' końcu.[72]. Dodatkowo mutacja w rejonie 5' UTR mRNA COBI, powodująca brak ekspresji mitochondrialnego genu COBI ulega supresji na skutek mutacji w genie DSS1[69]. Fakty te sugerują funkcjonalny związek 5' i 3' końca mRNA w mitochondriach drożdży.

Elementy *cis* stabilizujące mRNA w mitochondriach znajdują się na końcu 5' [73] podczas gdy degradacja zachodzi od końca 3' [58]. Pomostem

to chroni RNA przed degradacją przez NTP-zależną egzonukleazę [58]. *In vivo*, delekcja 3' końcowego odcinka genu kodującego rybosomalne białko Var1 powoduje brak jego ekspresji i niewydolność oddechową drożdży [68]. Teoria wydaje się też prawdopodobna w obliczu tego, że pozbawione tych sekwencji RNA, takie jak introny, są przedmiotem natychmiastowej degradacji.

VI. Degradacja mRNA w chloroplastach roślin

Mechanizmy zaangażowane w kontrolę stabilności i degradację mRNA w mitochondriach roślinnych są słabo poznane. Jak dotąd nie udało się zidentyfikować żadnego z białek biorących udział w tym procesie. Wiadomo na pewno, że niektóre, ale nie wszystkie, mitochondrialne mRNA są opatrzone stabilnymi strukturami drugorzędowymi na końcach 3' [76]. Struktury te, jeśli są obecne, wpływają na stabilność cząsteczek mRNA [77]. Zostało też udowod-

nione, że nie stanowią one sygnału terminacji transkrypcji jak u bakterii [78]. Dojrzałe końce 3' mitochondrialnych transkryptów powstają w wyniku procesowania dłuższych pre-mRNA. Ostatnio, na przykładzie słonecznikowego genu *atp1-orf522*, wykazano, że dojrzałe mRNA może być poliadenylowane na końcu 3', a poliadenylacja kieruje mRNA na drogę degradacji zarówno w układach *in vitro* jak *in vivo* [63].

Cechą charakterystyczną poliadenylacji w mitochondriach w porównaniu z chloroplastami, jest miejsce dołączania ogonów poli(A). Wykazano, że większość miejsc poliadenylacji transkryptów mitochondrialnych lokalizuje się na dojrzałym końcu 3', zazwyczaj za strukturami drugorzędowymi [79]. W chloroplastach większość miejsc dodawania ogonów poli(A) znajduje się na końcach 3' produktów endonukleolitycznego cięcia transkryptów [80]. Dojrzałe chloroplastowe transkrypty, zawierające na swoim 3' końcu struktury drugorzędowe, także mogą być poliadenylowane, ale z o wiele mniejszą częstością [44]. Do tej pory zanotowano cztery mitochondrialne transkrypty ulegające poliadenylacji, i w przypadku tych, które posiadały struktury drugorzędowe, ogony poli(A) były dodawane głównie po stronie 3' tych struktur [79]. Badania ogonów poli(A) dodanych do transkryptów mitochondrialnych wykazały, że są one homopolimeryczne [63].

We frakcji białek błonowych z mitochondriów słonecznika, a także w mitochondriach ziemniaka [79], wykryto dwie różniące się aktywności RNazowe. Udało się je rozdzielić przez wytrącanie siarczanem amonu. Okazało się, że pierwsza RNazowa aktywność jest niezależna od poliadenylacji. Zarówno substraty poliadenylowane, jak i niepoliadenylowane, były trawione z podobną szybkością. Odwrotnie, w przypadku drugiej aktywności substraty niepoliadenylowane były stabilne, podczas gdy poliadenylowane podlegały szybkiej degradacji. Analiza obu aktywności, na mitochondrialnym *atp9* mRNA z ziemniaka, za pomocą chromatografii cienkowarstwowej sugeruje, że za aktywność pierwszą odpowiada enzym będący endonukleazą, aktywność druga jest lub zawiera egzonukleazę RNA. Wykazano też, że druga aktywność jest zależna od obecności na końcu 3' ogona poli(A) a nie tylko jednoniciowego RNA — dodanie do końca 3' poliadenylowanego substratu siedmiu innych nukleotydów hamowało drugą aktywność RNazową [79]. Jak na razie nie można jeszcze określić, czy za aktywność egzonukleazową odpowiada enzym hydrolityczny, czy fosforolityczny, a może oba. Aby to określić potrzebne jest dokładne oczyszczenie białka.

Z danych otrzymanych do tej pory możemy wnioskować, że degradacja mRNA w mitochondriach roślinnych odbywa się głównie przez egzonukleolityczne trawienie od końca 3' transkryptów oznaczonych ogonami poli(A). Jako że struktury drugorzędowe w transkryptach poliadenylowanych są trawione przez egzonukleazy, możliwe, że poliadenylacja działa podobnie jak u bakterii umożliwiając RNazom pokonanie tych struktur, które normalnie stanowią dla nich przeszkodę. Nie wiadomo jednak, co znakuje odpowiednie transkrypty, żeby mogły stać się substratem poliadenylacji, do tej pory nie oczyszczono żadnego z enzymów biorących udział w tym procesie.

Problem degradacji RNA stał się przedmiotem intensywnych badań stosunkowo niedawno. Większość najważniejszych do tej pory odkryć miała miejsce w przeciągu ostatnich dziesięciu lat. Prace nadal są w trakcie i chociaż do tej pory ujawniono wiele znaczących faktów, które pozwoliły na zarysowanie pewnych schematów dotyczących tego procesu, to do dokładnego poznania procesów degradacji, a szczególnie sposobu ich regulacji potrzebne są dalsze badania.

Artykuł otrzymano 16 września 2002

Zaakceptowano do druku 8 maja 2003

Piśmiennictwo

1. Steege DA (2000) *RNA* 6: 1079-1090
2. Bessarab DA, Kaberdin VR, Wei CL, Liou GG, Lin-Chao S (1998) *Prot Natl Acad Sci U S A* 95: 3157-3161
3. Mackie GA (1998) *Nature* 395: 720-723
4. Lin-Chao S, Cohen SN (1991) *Cell* 65: 1233-1242
5. Kido M, Yamanaka K, Mitani T, Niki H, Ogura T, Hiraga S (1996) *J Bacteriol* 178: 3917-3925
6. Yancey SD, Kushner SR (1990) *Biochimie* 72: 835-843
7. Donovan WP, Kushner SR (1986) *Proc Natl Acad Sci U S A* 83: 120-124
8. Spickler C, Mackie GA (2000) *J Bacteriol* 182: 2422-2427
9. Stern DB, Grissem W (1987) *Cell* 51: 1145-1157
10. Ghosh S, Deutscher MP (1999) *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 4372-4377
11. Blum E, Carpousis AJ, Higgins CF (1999) *J Biol Chem* 274: 4009-4016
12. Carpousis AJ, VanHouwe G, Ehrtsmann C, Krisch HM (1994) *Cell* 76: 889-900
13. Py B, Higgins CF, Krisch HM, Carpousis AJ (1996) *Nature* 381: 169-172
14. Kalman M, Murphy H, Cashel M (1991) *New Biol* 3: 886-895
15. Kaberdin VR, Miczak A, Jakobsen JS, Lin-Chao S, McDowell KJ, von Gabain A (1998) *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 11637-11642
16. Vanzo NF, Li YS, Py B, Blum E, Higgins CF, Raynal LC, Krisch HM, Carpousis AJ (1998) *Genes Dev* 12: 2770-2781
17. Liou GG, Jane WN, Cohen SN, Lin NS, Lin-Chao S (2001) *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 63-68
18. Cao GJ, Sarkar N (1992) *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 7546-7550
19. Sarkar N (1997) *Annu Rev Biochem* 66: 173-197
20. Coburn GA, Mackie GA (1998) *J Mol Biol* 279: 1061-1074

21. Coburn GA, Mackie GA (1999) *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **62**: 55-108
22. Haugel-Nielsen J, Hajnsdorf E, Regnier P (1996) *EMBO J* **15**: 3144-3152
23. Goodrich AF, Steege DA (1999) *RNA* **5**: 972-985
24. Pepe CM, Maslesa-Galic S, Simons RW (1994) *Mol Microbiol* **13**: 1133-1142
25. Raynal LC, Carpousis AJ (1999) *Mol Microbiol* **32**: 765-775
26. Shyu AB, Belasco JG, Greenberg ME (1991) *Genes Dev* **5**: 221-231
27. Decker CJ, Parker R (1993) *Genes Dev* **7**: 1632-1643
28. Chen CY, Chen TM, Shyu AB (1994) *Mol Cell Biol* **14**: 416-426
29. Gingras AC, Raught B, Sonenberg N (1999) *Annu Rev Biochem* **68**: 913-963
30. Schwartz DC, Parker R (2000) *Mol Cell Biol* **20**: 7933-7942
31. Tucker M, Valencia-Sanchez MA, Staples RR, Chen J, Denis CL, Parker R (2001) *Cell* **104**: 377-386
32. Bouveret E, Rigaut G, Shevchenko A, Wilm M, Seraphin B (2000) *EMBO J* **19**: 1661-1671
33. He W, Parker R (2000) *Curr Opin Cell Biol* **12**: 346-50
34. Muhlradd D, Decker CJ, Parker R (1995) *Mol Cell Biol* **15**: 2145-2156
35. Jacobs JS, Anderson AR, Parker RP (1998) *EMBO J* **17**: 1497-506
36. Allmang C, Mitchell P, Petfalski E, Tollrvey D (2000) *Nucleic Acids Res* **28**: 1684-1691
37. Mitchell P, Petfalski E, Shevchenko A, Mann M, Tollrvey D (1997) *Cell* **91**: 457-466
38. Muhlradd D, Parker R (1994) *Nature* **370**: 578-581
39. van Hoof A, Frischmeyer PA, Dietz HC, Parker R (2002) *Science* **295**: 2262-2264
40. He F, Peltz SW, Donahue JL, Rosbash M, Jacobson A (1993) *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**: 7034-7038
41. Pulak R, Anderson P (1993) *Genes Dev* **7**: 1885-1897
42. Binder R, Horowitz JA, Basilion JP, Koeller DM, Klausner RD, Harford JB (1994) *EMBO J* **13**: 1969-1980
43. Brown BD, Zipkin ID, Harland RM (1993) *Genes Dev* **7**: 1620-1631
44. Lisitsky I, Klaff P, Schuster G (1996) *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 13398-13403
45. Klaff P (1995) *Nucleic Acids Res* **23**: 4885-4892
46. Hayes R, Kudla J, Schuster G, Gabay L, Maliga P, Grissem W (1996) *EMBO J* **15**: 1132-1141
47. Lisitsky I, Kotler A, Schuster G (1997) *J Biol Chem* **272**: 17648-17653
48. Baginsky S, Shteiman-Kotler A, Liveanu V, Yehudai-Resheff S, Schuster G, Grissem W (2001) *RNA* **7**: 1464-1475
49. Littauer UZ, Soreq H (1982) *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **27**: 53-83
50. Yehudai-Resheff S, Hirsh M, Schuster G (2001) *Mol Cell Biol* **21**: 5408-5416
51. Mohanty BK, Kushner SR (2000) *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 11966-11971
52. Lopez PJ, Marchand I, Joyce SA, Dreyfus M (1999) *Mol Microbiol* **33**: 188-199
53. Ow MC, Liu Q, Kushner SR (2000) *Mol Microbiol* **38**: 854-866
54. Regnier P, Arraiano CM (2000) *Bioessays* **22**: 235-244
55. Hayes R, Kudla J, Grissem W (1999) *Trends Biochem Sci* **24**: 199-202
56. Margossian SP, Butow RA (1996) *Trends Biochem Sci* **21**: 392-396
57. Dziembowski A, Stepień PP (2001) *Methods Enzymol* **342**: 367-378
58. Min J, Heuertz RM, Zassenhaus HP (1993) *J Biol Chem* **268**: 7350-7357
59. Dziembowski A, Piwowarski J, Hoser R, Minczuk M, Dmochowska A, Siep M, Van Der Spek H, Grivell L, Stepień PP (2002) *J Biol Chem* **278**: 1603-1611
60. Stepień PP, Margossian SP, Landsman D, Butow RA (1992) *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**: 6813-6817
61. Dmochowska A, Stankiewicz P, Golik P, Stepień PP, Bocian E, Hansmann I, Bartnik E (1998) *Cytogenet Cell Genet* **83**: 84-85
62. Dmochowska A, Kalita K, Krawczyk M, Golik P, Mroczek K, Lazowska J, Stepień PP, Bartnik E (1999) *Acta Biochim Polon* **46**: 155-162
63. Gagliardi D, Leaver CJ (1999) *EMBO J* **18**: 3757-3766
64. Dmochowska A, Golik P, Stepień PP (1995) *Curr Genet* **28**: 108-112
65. Zassenhaus HP, Hofmann TJ, Uthayashanker R, Vincent RD, Zona M (1988) *Nucleic Acids Res* **16**: 3283-3296
66. Hanekamp T, Thorsness PE (1999) *Curr Genet* **34**: 438-448
67. Dziembowski A, Malewicz M, Minczuk M, Golik P, Dmochowska A, Stepień PP (1998) *Mol Gen Genet* **260**: 108-114
68. Butow RA, Zhu H, Perlman P, Conrad-Webb H (1989) *Genome* **31**: 757-760
69. Chen W, Islas-Osuna MA, Dieckmann CL (1999) *Genetics* **151**: 1315-1325
70. Mangus DA, Jacobson A (1999) *Methods* **17**: 28-37
71. Węgiński T, Dmochowska A, Jabłonowska A, Dziembowski A, Bartnik E, Stepień PP (1998) *Acta Biochim Polon* **4**: 935-940
72. Weisenberger G, Fox TD (1997) *Mol Cell Biol* **17**: 2816-2827
73. Grivell LA (1995) *Crit Rev Biochem Mol Biol* **30**: 121-164
74. Hofmann TJ, Min J, Zassenhaus HP (1993) *Yeast* **9**: 1319-1330
75. Li H, Zassenhaus HP (1999) *Biochem Biophys Res Commun* **261**: 740-745
76. Schuster W, Hiesel R, Isaac PG, Leaver CJ, Brennicke A (1986) *Nucleic Acids Res* **14**: 5943-5954
77. Bellaoui M, Pelletier G, Budarf F (1997) *EMBO J* **16**: 5057-5068
78. Dombrowski S, Brennicke A, Binder S (1997) *EMBO J* **16**: 5069-5076
79. Gagliardi D, Perrin R, Marechal-Drouard L, Grienemberger JM, Leaver CJ (2001) *J Biol Chem* **276**: 43541-43547
80. Kudla J, Hayes R, Grissem W (1996) *EMBO J* **15**: 7137-7146

Mutacje adaptacyjne

Adaptive mutations

ANETTA NOWOSIELSKA¹, ELŻBIETA GRZESIUK²

Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Modele badań mutacji adaptacyjnych w komórkach *E. coli*
 - II-1. Model plazmidowy
 - II-2. Model chromosomalny
 - II-3. Rewersja do prototrofii
- III. Mechanizmy odpowiedzialne za powstawanie mutacji adaptacyjnych
 - III-1. Uszkodzenia DNA w nie dzielących się komórkach
 - III-2. Rola systemów naprawy DNA w mutageniezie adaptacyjnej
 - III-3. Rekombinacja homologiczna
 - III-4. Hipermutagenność i amplifikacja genów w mutageniezie adaptacyjnej
 - III-5. Odpowiedź SOS
- IV. Znaczenie mutagenезы adaptacyjnej
- V. Piśmiennictwo

Contents:

- I. Introduction
- II. *E. coli*: Bacterial models for adaptive mutations studies
 - II-1. Plasmid model
 - II-2. Chromosomal model
 - II-3. Reversion to prototrophy
- III. The mechanisms responsible for appearance of adaptive mutations
 - III-1. DNA damage in non-dividing cells
 - III-2. The role of DNA repair in adaptive mutagenesis
 - III-3. Homologous recombination
 - III-4. Hypermutability and gene amplification in adaptive mutagenesis
 - III-5. SOS response
- IV. Significance of adaptive mutations
- V. References

Wykaz stosowanych skrótów: Lac — laktoza; *lacZ* — gen kodujący β -galaktozydazę; *lacI* — gen kodujący represor operonu *lac*; RecA, B, C, D, G — białka biorące udział w homologicznej rekombinacji; F' — episom; MMR — system naprawy błędnie sparowanych zasad; MutS, L, H — białka systemu MMR; NER — system naprawy przez wycinanie nukleotydów; UvrABC — białka systemu NER; *ebgR* — gen kodujący represor operonu *ebg*; *ebgAC* — gen kodujący tzw. drugą β -galaktozydazę; *bglF* — gen kodujący fosfotransferazę odpowiedzialną za transport β -glikozydów; Lu — laktuloza; IS — element insercyjny; *trpA* — gen kodujący α -syntazę tryptofanową; *trpB* — gen kodujący β -syntazę tryptofanową; 8-okso-dGTP — 8-okso-dezoksyguanozynotrifosforan; SOD — dyzmutaza ponadtlenkowa; DBS — podwójne pęknięcia nici DNA; DBE — dwuniciowe końce DNA; SOS — system naprawy i mutagenезы; LexA — represor regulonu SOS; RecA — białko uczestniczące w rekombinacji; RecA* — induktor regulonu SOS; RecF — białko uczestniczące w rekombinacji i odpowiedzi SOS; PsiB — białko, inhibitor mutagenезы adaptacyjnej; Din I — białko, inhibitor mutagenезы adaptacyjnej; *polB* — gen kodujący polimerazę II; *dinB* — gen kodujący polimerazę IV; *umuDC* — geny kodujące polimerazę V.

I. WSTĘP

Materiał genetyczny każdej żywej komórki jest nieustannie narażony na działanie różnorodnych czynników fizycznych i chemicznych. Mogą to być zarówno czynniki egzogenne, występujące w środowisku jak i endogenne czyli takie, które powstają w procesach metabolicznych zachodzących wewnątrz komórki. Prawdopodobnie w każdej komórce co sekundę dochodzi do uszkodzenia DNA, a ponad 10 tysięcy zasad dziennie jest uwalnianych z DNA w tak zwanych procesach spontanicznych. Jeśli zmiana w DNA nie będzie naprawiona, a wręcz przeciwnie, utrwalona podczas replikacji, to powstanie mutacja, trwała zmiana, którą dziedziczy następne pokolenie komórek.

Cała wiedza dotycząca mutagenезы czyli procesu powstawania mutacji, jak również mechanizmów naprawy DNA, pochodzi z doświadczeń wykonywanych w optymalnych warunkach hodowli komórek będących w logarytmicznej fazie wzrostu. Wiadomo jednak, że procesy mutagenезы zachodzą również w komórkach nie dzielących się. Stwierdzenie to jest bardzo ważne, gdyż w przyrodzie większość komórek, zarówno tych stanowiących odrębny organizm, jak i tych budujących organizmy wielokomórkowe,

¹Dr, ²dr hab.; Instytut Biochemii i Biofizyki PAN, ul. Pawińskiego 5a, 02-106 Warszawa; e-mail: elag@ibb.waw.pl

przez większą część życia pozostaje w stanie spoczynku. Dużym uproszczeniem byłoby zatem odnośnienie zjawisk obserwowanych w hodowlach w fazie logarytmicznej do realnego świata ewolucji i karcinogenezy. Pewne światło na ten problem rzuciły badania nad mutacjami adaptacyjnymi. Pierwsze kontrowersyjne doniesienia na temat spontanicznych mutacji w nie dzielących się komórkach ukazały się ponad 40 lat temu, kiedy R y a n i współpracownicy stwierdzili, że mutacje mogą powstawać w bakteriach, w których nie stwierdzono replikacji DNA [1-3]. W latach 80-tych podobne obserwacje opublikował S h a p i r o [4]. Jednak dopiero wyniki badań C a i r n s a zamieszczone w pracy „Origin of mutants” w 1988 r. pokazały, że w populacji bakterii *E. coli* poddanej nie letalnej selekcji (selekcję może stanowić np. brak w pożywce aminokwasu umożliwiającego wzrost komórek auktotrofa), w warunkach głodzenia powstawały wyłącznie mutacje „korzystne” dla komórki, przy czym nie obserwowano mutacji „nieużytecznych” [5]. Mutację można było uznać za „użyteczną” jeśli umożliwiała ona wzrost bakterii na danym podłożu. Omawiane mutacje nazywano adaptacyjnymi (ang. *adaptive*), ukierunkowanymi (ang. *directed*), mutacjami fazy stacjonarnej (ang. *stationary phase*) bądź związanymi z głodzeniem (ang. *starvation-associated*). Najczęściej stosuje się wprowadzoną w 1991 r. nazwę mutacje adaptacyjne [6]. Ma ona oznaczać proces przyczyniający się do powstania mutacji specyficznych w stosunku do presji selekcyjnej, ale nie tych szkodliwych czy niepotrzebnych [7]. Z czasem definicja mutacji adaptacyjnych okazała się nazbyt zawężona, gdyż oprócz mutacji „użytecznych” znajdowano dodatkowe mutacje w genach, które nie podlegały presji selekcyjnej.

Zjawisko powstawania mutacji adaptacyjnych można uznać za zjawisko ogólne, ponieważ zachodzi ono zarówno u *Prokaryota* (bakterie) jak i u *Eukaryota* (drożdże). W komórkach bakterii występuje w wielu *loci*, a jego źródłem są różnorodne uszkodzenia DNA.

II. Modele badań mutacji adaptacyjnych w komórkach *E. coli*

Najczęściej stosowanymi obiektami badań zjawiska mutagenazy adaptacyjnej są szczepy *E. coli*, w których łatwo można zaobserwować fenotyp jaki daje rewersja określonej mutacji usytuowanej na plazmidzie bądź na chromosomie. Stosowane są dwa rodzaje rewersji: auktotrofii do prototrofii oraz mutacji w genie *lac*, która umożliwia wykorzystanie lak-

tozy jako jedyne źródła węgla. Ten ostatni układ jest stosowany najczęściej.

II-1. Model plazmidowy

Rewersję $Lac^- \rightarrow Lac^+$ bada się w szczepie *E. coli* FC40, który wprawdzie nie może wykorzystywać laktozy jako jedyne źródła węgla ale często w obecności laktozy rewertuje do Lac^+ . W szczepie FC40 zmutowany allel *lac* zlokalizowany jest na episomie F' natomiast chromosomalny operon laktozowy został usunięty [8, 9]. Omawiany system jest szczególnie ze względu na to, że rewersja adaptacyjna zachodzi na plazmidzie. Powstawanie adaptacyjnych rewertantów Lac^+ zależy między innymi od funkcji rekombinacyjnej białek RecA i RecBCD, a oprócz tego jest uwarunkowane obecnością genu plazmidowego *tra*, który koduje białko umożliwiające transfer F' do komórek bakteryjnych. Jeśli zmutowany allel *lac* jest zlokalizowany na chromosomie to proces powstawania mutacji adaptacyjnych zachodzi 25-100 razy wolniej niż w przypadku jego lokalizacji na plazmidzie. Ponadto proces ten nie jest zależny od funkcji rekombinacyjnej białek RecA, RecD czy RecG [10, 11]. Inną istotną różnicą wynikającą z różnej lokalizacji mutacji jest fakt, że mutacje adaptacyjne w przypadku allelu chromosomalnego nie są prostymi delecjami –1pż jak w przypadku mutacji zlokalizowanej na plazmidzie F'. Na podstawie tych różnic można stwierdzić, że istnieją odrębne mechanizmy odpowiedzialne za powstawanie mutacji na plazmidzie i w chromosomie.

Rewersja adaptacyjna do Lac^+ przypomina mutacje zależne od wzrostu z dwóch powodów: po pierwsze rewersje te są wynikiem działania głównej polimerazy replikacyjnej *E. coli*, pol III (choć polimeraza II również jest aktywna w komórkach fazy stacjonarnej); po drugie, mutacje adaptacyjne są korygowane przez system naprawy błędnie sparowanych zasad (MMR), co udowodniono wykazując, że w warunkach nadprodukcji białek MMR poziom mutacji obniża się 2-5 razy. Okazało się również, że w warunkach selekcji komórek zdolnych do wzrostu na laktozie, mutacje powstają nie tylko w genie *lac* lecz także w innych genach [12, 13].

II-2. Model chromosomalny

Podstawą badań mutacji adaptacyjnych przy pomocy modelu chromosomalnego są mutacje typu nonsense w genach, których produkty uczestniczą w szlakach syntezy aminokwasów bądź katabolizmie węglowodanów.

W komórkach *E. coli* obok operonu laktozowego istnieje podobnie regulowany operon *ebg*, w skład którego wchodzi kodujący represor gen *ebgR* oraz gen *ebgAC* kodujący tzw. drugą β -galaktozydazę. W przypadku gdy w komórce brak genu *lacZ*, ale jest obecna permeaza laktozowa, mutacje w operonie *ebg* pozwalają na wzrost na podłożu z laktozą (Lac) lub z innymi cukrami takimi jak np. laktuloza (Lu). Mutacje w genie *ebgAC* podzielono na dwie klasy. Mutacje klasy I (Lac⁺ Lu⁻) pozwalają wprowadzić na wzrost na podłożu z laktozą jako jedynym źródłem węgla, ale na podłożu z laktulozą wzrost jest bardzo słaby. Natomiast mutacje klasy II (Lac⁺ Lu⁺) prowadzą do wzrostu na obu cukrach. Jednak prawidłowy wzrost tych mutantów następuje jedynie wówczas, gdy na skutek dodatkowej mutacji w genie represora *ebg* (*ebgR*⁻) nastąpi derepresja całego operonu i konstytutywna ekspresja enzymu EbgAC. Obserwowane w tym układzie mutacje adaptacyjne pojawiały się w komórkach dzielących się bardzo wolno, co wskazuje, że to nie brak wzrostu jest czynnikiem warunkującym powstawanie mutacji adaptacyjnych, lecz stres związany z niemożnością wzrostu w tempie charakterystycznym dla komórek bakteryjnych. Co ciekawe, jest to również pierwszy przykład recesywnych mutacji adaptacyjnych, które ponadto dotyczyły genu represora [14].

Operon *bgl* koduje geny odpowiedzialne za rozkład takich β -glikozydów jak salicyna. W szczepach *E. coli* K12 operon ten jest nieaktywny na skutek oddziaływań białek specyficznie wiążących się z sekwencją genu regulatorowego *bglR*, zlokalizowanego powyżej promotora operonu *bgl*. Dysponując szczepem, który niósł nieindukowalny gen *bglR* (*bglR*⁰) oraz zinktywowany przez element IS103 gen *bglF*, kodujący fosfotransferazę odpowiedzialną za transport β -glikozydów, Hall [15] wykazał, że po 10 dniach inkubacji na podłożu MacConkey'a na koloniach Sal⁻ pojawiały się papille Sal⁺. Do powstania mutacji Sal⁺ musiało dojść dzięki dwóm zdarzeniom: precyzyjnemu wycięciu elementu IS z *bglF* i rewersji *bglR*⁰ → *bglR*⁺, przy czym wycięcie IS poprzedzało zajście mutacji w *bglR*. Najczęstszymi mutacjami spontanicznymi, które aktywowały operon *bgl* były insercje elementów IS1 i IS5 w obszarze *bglR*.

II-3. Rewersja do prototrofii

Obok rewersji Lac⁻ → Lac⁺ do badania mutagenozy adaptacyjnej w *E. coli* wykorzystuje się rewersję do prototrofii mutacji genów szlaku metabolicznego

tyrozyny, leucyny i tryptofanu oraz w *Salmonella typhimurium* w metabolizmie histydyny.

Do badań rewersji adaptacyjnych Hall [16] wykorzystał podwójne mutanty w genach *trpA* i *trpB*. Geny te kodują odpowiednio podjednostki α i β syntazy tryptofanowej. Rewersja w jednym ze zmutowanych alleli nie przywracała komórkom zdolności do wzrostu na podłożu bez tryptofanu. Jednak po kilkunastu dniach inkubacji na płytkach z ograniczoną ilością tryptofanu, pozwalającą jedynie na wytworzenie małych kolonii, obserwowano pojawianie się papilli Trp⁺. Zjawisko to tłumaczy się „nieszczelnością” allelu *trpA*⁻. Produkt tego genu rozkłada fosforan indoglicerolu do indolu, przekształcanego z kolei w tryptofan przez produkt genu *trpB*. A więc podwójne mutanty *trpAB* akumulowały indol i kiedy zachodziła rewersja mutacji *trpB* nagromadzony indol umożliwiał wzrost komórkom rewertantów, wśród których mogła również zajść kolejna mutacja w genie *trpA* prowadząca do powstania papilli Trp⁺ [17].

W niniejszym artykule przedstawiono nowy model badania mutacji adaptacyjnych, który wykorzystuje rewersję mutacji w genie szlaku metabolizmu argininy *argE*_{30C} w bakteriach *E. coli* [18]. Zaletą tego modelu jest możliwość badania wpływu mutacji w innych genach na poziom mutacji związanych z głodem, a także określenia specyficzności mutacji Arg⁺ poprzez analizę ich fenotypu i obecność supresorów.

III. Mechanizmy odpowiedzialne za powstawanie mutacji adaptacyjnych

Bakterie będące w fazie stacjonarnej, a więc w warunkach niedoboru substancji odżywczych, spowalniają swój metabolizm, a nawet zmieniają go dostosowując do zaistniałych warunków stresowych. Takie przestawienie metabolizmu umożliwia bakteriom utrzymanie się przy życiu w niekorzystnych warunkach, jak również pozwala na tworzenie zmian genetycznych pomocnych w odzyskaniu zdolności do wzrostu. Często obserwuje się wzrost liczby komórek bakteryjnych poddanych nieletalnej selekcji, który nie jest spowodowany pojawieniem się „użytecznej” mutacji, lecz wynika z zanieczyszczenia podłoża substancjami mogącymi stanowić źródło węgla dla głodzonych bakterii. Aby wyeliminować to zjawisko stosuje się szczepy „czyściciele” (ang. *scavengers*), które zużywają potencjalne źródła energii występujące w podłożu nie formując przy tym kolonii. W wielu przypadkach w trakcie kilkunastodniowego głodzenia obserwowano najpierw spa-

dek, a następnie wzrost liczby żywych komórek. Wydaje się więc uzasadnione stwierdzenie, że komórki bakteryjne fazy stacjonarnej nie są komórkami spoczynkowymi ale raczej wolno rosnącymi i wolno dzielącymi się. Wobec tego należy się spodziewać pewnego poziomu syntezy DNA, który umożliwiałby utrwalanie uszkodzeń i powstawanie mutacji. W tym przypadku synteza DNA może zachodzić przy braku jakiegokolwiek przyrostu całkowitej masy bakterii, a nawet wtedy, gdy ta masa maleje. Badania przeprowadzone na *E. coli* wykazały, że w nie dzielących się komórkach DNA jest syntetyzowane w ilości odpowiadającej od 0,5 do 5% całego genomu [7]. Natomiast z obserwacji szybkości powstawania mutacji adaptacyjnych w mutancie *mutT* (przyjmując, że mutacje te powstały przez inkorporację 8-okso-dGTP podczas syntezy DNA *de novo*) wynika, że poziom syntezy DNA stanowi 25% dobowej syntezy genomowego DNA [19]. Przytoczone dane wskazują, że zachodzą istotne różnice pomiędzy procesem powstawania mutacji w komórkach intensywnie dzielących się i w komórkach fazy stacjonarnej.

III-1. Uszkodzenia DNA w nie dzielących się komórkach

W DNA komórek fazy stacjonarnej mogą gromadzić się uszkodzenia indukowane czynnikami endogennymi. Jeżeli nie będą one naprawione przez któryś z komórkowych systemów reparacyjnych to zostaną utrwalone w postaci mutacji. Najpowszechniejsze uszkodzenia DNA są wynikiem procesów alkilacji i utleniania.

Do endogennych czynników alkilujących zasady DNA należą S-adenozylometionina, rodniki alkilowe powstające w procesie utleniania lipidów oraz endogennie nitrozowane amidy i poliaminy. Związki te alkilują tlen w pozycji O-6 guaniny lub O-4 tyminy. Brak enzymów naprawiających O⁶-alkiloguaninę i O⁴-alkilotyminę powoduje podwyższenie poziomu mutacji typu tranzycji w komórkach fazy stacjonarnej. Wydaje się, że jedną z przyczyn powstawania mutacji adaptacyjnych jest wyczerpanie się puli alkylotransferaz — enzymów naprawiających zalkilowane zasady w DNA [20].

Głównym produktem utleniania zasad jest 8-okso-2'-deoksyguanozyna (8-oksodG). Jej występowanie jest związane z procesami starzenia się i karcinogenezy [21, 22]. Obecność 8-oksodG powoduje powstawanie błędów w czasie replikacji, ponieważ często naprzeciw tej zmodyfikowanej zasady włączana jest adenina zamiast cytozyny, co prowadzi do transwersji GC→TA [23-26]. Udział 8-oksodG w

powstawaniu mutacji adaptacyjnych potwierdzają doświadczenia z głodzonymi bakteriami niosącymi mutacje w genach *mutM* i *mutY*. Mutacja *mutM* nieznacznie zwiększa szybkość powstawania mutacji adaptacyjnych. Natomiast większy przyrost tego typu mutacji obserwowano w szczepie *mutY*, a największy w podwójnym mutancie *mutMmutY* [27, 28]. Nadprodukcja glikozylaz z wysokokopijnych plamidów, kodowanych przez geny *mutM* i *mutY*, redukuje szybkość powstawania mutacji fazy stacjonarnej o około 50%. Nie wiadomo jednak co jest źródłem 8-oksodG w głodzonych komórkach. Zarówno ponadtlenek wodoru, nadtlenek wodoru jak i rodnik hydroksylowy mogą generować 8-oksodG. Brak dysmutazy ponadtlenkowej (SOD) znacznie podwyższa szybkość powstawania rewersji adaptacyjnych His⁺ w bakteriach z mutacją *his*⁻ [29]. Ponieważ SOD katalizuje wytwarzanie tlenu i nadtlenu wodoru z ponadtlenku, wydaje się, że ponadtlenek może przyczyniać się do powstawania mutacji w komórkach spoczynkowych. Przypuszczenie to zdaje się potwierdzać doświadczenie, w którym po dodaniu manganoporfiryny, wykazującej aktywność dysmutazy nadtlenukowej, szybkość pojawiania się mutantów fazy stacjonarnej w szczepie z aktywnym SOD ulega dwukrotnemu zmniejszeniu.

Ciekawe wyniki uzyskano badając wpływ karotenoidów, znanych „zmiataaczy” aktywnych form tlenu singletowego *in vitro* [30] jak i *in vivo* [31], na powstawanie mutacji adaptacyjnych. Geny produkujące karotenoidy pochodzące z *Erwina herbicola* sklonowano i wprowadzono do szczepów bakteryjnych, w których jak podejrzewano 8-oksodG indukuje powstawanie mutacji związanych z głodzeniem. Jasno-żółte bakterie wytwarzające karotenoidy charakteryzowały się obniżoną szybkością powstawania mutacji w porównaniu ze szczepami bez karotenoidów [32]. Chociaż reaktywność karotenoidów jest sprawą złożoną, a wybiórczość ich działania w stosunku do tlenu singletowego nie jest ścisła, to jednak przypuszcza się, że zarówno tlen singletowy jak i ponadtlenek mogą mieć znaczący udział w indukowaniu mutacji związanych z głodzeniem.

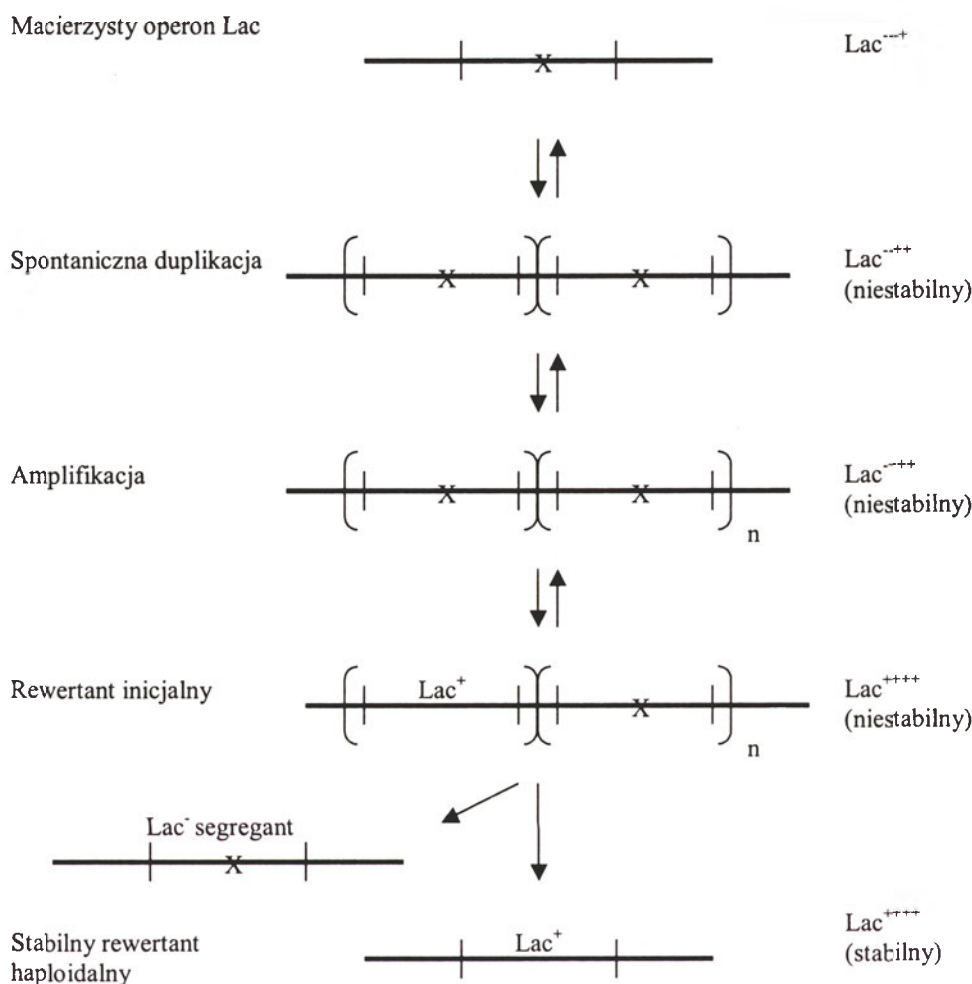
III-2. Rola systemów naprawy DNA w mutagenezie adaptacyjnej

Wydaje się prawdopodobnym, że jednym z czynników stymulujących proces mutagenezy adaptacyjnej w komórkach wolno rosnących może być niewydolność komórkowych systemów naprawczych. W istocie, eliminacja enzymów biorących udział w naprawie uszkodzeń DNA w wielu przypadkach przy-

czynia się do podwyższenia poziomu mutacji adaptacyjnych.

W 1988 r. S t a h l po raz pierwszy wysunął hipotezę, że mutacje adaptacyjne mogą powstawać w wyniku słabszego działania naprawy przez wycinanie

system MMR nie jest w pełni wydajny [8, 9]. Z drugiej strony syntetyzowane w warunkach głodu DNA może zawierać więcej pojedynczych delecji w ciągach powtórzonych nukleotydów, co daje takie samo spektrum mutacji jak w przypadku defektyw-



Ryc. 1. Model powstawania mutacji adaptacyjnych na drodze amplifikacji genu *lac* w szczepie FC40. Operon *lac* zawiera mutację w genie kodującym β -galaktozydazę. „Nieszczelność” tej mutacji powoduje powstanie pewnej ilości prawidłowej β -galaktozydazy. Spontaniczna duplikacja zmutowanego genu prowadzi do nieznacznego zwiększenia poziomu prawidłowego enzymu, a amplifikacja zapewnia komórce bakteryjnej taką jego ilość, która umożliwia wzrost na podłożu, w którym jedynym źródłem węgla jest laktoza. W ten sposób dochodzi do powstania stabilnego rewertanta *Lac*⁺.

błędnie sparowanych zasad (MMR) w komórkach głodzonych [33]. Okazało się, że w takich komórkach poziom niektórych białek naprawy MMR jest znacznie obniżony, natomiast ilość mutantów fazy stacjonarnej podwyższona [6, 34, 35]. W układzie FC40 mutacja w genie *lacI* jest „nieszczelna” i powstaje pewna ilość aktywnej β -galaktozydazy co oznacza, że podczas selekcji laktozowej utrzymywany jest odpowiedni poziom białek biorących udział w MMR [36]. Jednak spektrum mutacji w FC40 składające się wyłącznie z jednozasadowych delecji w szeregu powtarzających się zasad jest dokładnie takie, jak w przypadku defektywnego MMR, co może oznaczać, że w głodzonych bakteriach FC40

nej podjednostki korektorskiej głównej polimerazy replikacyjnej *E. coli*, polimerazy III. Kolejne badania pokazały, że spośród białek MMR, w komórkach fazy stacjonarnej spada poziom białek MutS i MutH ale nie MutL [37, 38] i właśnie to ostatnie białko okazało się czynnikiem ograniczającym działanie systemu MMR w warunkach głodzenia. Pokazano także, że nadprodukcja białka MutL jest jedynym koniecznym warunkiem przywrócenia aktywności MMR i obniżenia poziomu mutacji adaptacyjnych [39, 40].

Naprawa przez wycinanie nukleotydów (NER) mogłaby ograniczać powstawanie mutacji w komórkach głodzonych, lub przeciwnie, stać się potencjalnym źródłem mutacji, które powstawałyby w czasie

syntezy DNA zachodzącej w ostatnim etapie naprawy. Okazało się jednak, że wyłączenie NER poprzez mutacje *uvrA* czy *uvrB* albo w ogóle nie wpływało na poziom mutacji podczas selekcji lub wpływ ten był nieznaczny [5, 40-42]. Inne dane wskazują na pewien udział naprawy NER w mutageniezie adaptacyjnej [7] biorąc jednak pod uwagę wszystkie wyniki uzyskane w różnych systemach badawczych wydaje się, że naprawa, w której uczestniczą białka UvrABC nie jest konieczna do powstawania mutacji fazy stacjonarnej.

III-3. Rekombinacja homologiczna

Wyniki wcześniejszych badań nad udziałem rekombinacji w mutageniezie adaptacyjnej w systemie FC40 pozwalały stwierdzić, że zależność powstawania mutacji adaptacyjnych od rekombinacji dotyczy wyłącznie plazmidu F'. Późniejsze doświadczenia pokazały, że proces rekombinacji obejmuje cały genom [43]. W komórkach poddanych długotrwałemu stresowi gromadzą się liczne uszkodzenia, w tym podwójne pęknięcia nici DNA (ang. DSBs — *double strand breaks*), które z kolei mogą stymulować rekombinację. Na tym etapie zachodzi również synteza DNA. Przyjmuje się, że błędy popełniane przez polimerazę w miejscach naprawy DSBs podczas rekombinacji homologicznej przyczyniają się do powstawania mutacji adaptacyjnych [44, 45]. Sugeruje się, że DSBs pojawiają się w komórkach podczas stresu związanego z głodzeniem na podłożu laktozowym [10, 44, 46-49]. Podwójne pęknięcia DNA mogą być spowodowane zatrzymaniem widełek replikacyjnych [10, 49] np. przez uszkodzenia oksydacyjne [48]. Nukleaza RecBCD (egzonukleaza V), będąc specyficzną w stosunku do DSBs i dysponując właściwościami helikazy, przyłącza się do dwuniciowych końców DNA (ang. DSEs — *double strand ends*), nadtrawiając je i rozplatając. Prowadzi to do powstania końców jednoniciowego DNA. Końce te są wykorzystywane przez białko RecA do inwazji nici homologicznego DNA tworząc przemieszczającą się pętlę D (ang. D loop), promując replikację [44, 50, 51]. Wolny koniec 3' może służyć jako primer dla polimerazy III. Błędy popełniane przez polimerazę mogą nie być naprawione z powodu przejściowej niewydolności systemu MMR. Utrwalone, mogą prowadzić do mutacji Lac⁺. Drogą alternatywną jest inwazja końca 5' pętli D. Koniec ten nie może być primerem dla polimerazy III i wobec tego nie dochodzi do replikacji DNA lecz do homologicznej rekombinacji [51, 52].

III-4. Hipermutagenność i amplifikacja genów w mutageniezie adaptacyjnej

W 1990 r. Hall wysunął hipotezę hipermutacji, jako mechanizmu generującego mutacje adaptacyjne [16]. Autor zakłada, że wśród komórek poddanych stresowi wyodrębnia się pewna subpopulacja, która wykazuje stan podwyższonej mutagenności. W komórkach tej subpopulacji można spodziewać się powstawania wielu mutacji w różnych częściach genomu. W momencie pojawienia się mutacji, która uwolni komórkę od stresu np. przez umożliwienie syntezy brakującego aminokwasu, następuje jej wyjście ze stanu hipermutagenności. Jeśli wśród nagromadzonych mutacji żadna nie okaże się użyteczną, komórka ginie. Hipoteza ta tłumaczy zatem występowanie, obok mutacji adaptacyjnych, mutacji nie selekcyjnych. Ten model okazał się prawdziwy w przypadku bakterii *E. coli* FC40. W szczepie tym zaobserwowano wysoką częstość mutacji w wielu miejscach genomu w koloniach Lac⁺ ale nie w głównej populacji komórek Lac⁻ poddanych selekcji laktozowej [13, 53]. Zaobserwowano również „gorące” i „zimne” miejsca dla mutacji fazy stacjonarnej zależnych od rekombinacji. Przypuszcza się, że występowanie tych obszarów zależy od nagromadzenia dwuniciowych pęknięć w genomowym DNA [47, 54]. Czynnikiem promującym stan podwyższonej mutagenności może być rekombinacja indukowana przez dwuniciowe pęknięcia. Ponieważ początkowo związek pomiędzy zależnym od rekombinacji mechanizmem powstawania mutacji fazy stacjonarnej a mutacjami chromosomalnymi wzbudzał kontrowersje, postanowiono sprawdzić czy rekombinacyjny mechanizm mutagenyzy adaptacyjnej wpływa na genom bakteryjny. Zbadano mutacje w genach *recD* i *recG*, które podwyższają poziom zależnych od rekombinacji mutacji adaptacyjnych w genie *lac* na plazmidzie F' [44, 52, 55]. Zarówno mutacja w *recD*, prowadząca do hiperrekombinacji [56, 57] jak i mutacja w genie *recG* [52, 58, 59] zwiększają liczbę intermediatów rekombinacyjnych promujących replikację. Bull i wsp. [43] wykazali, że mutacje w tych genach podwyższają częstość mutacji chromosomalnych defektywnych w fermentacji ksylozy, maltozy i fruktozy. Te dane sugerują, że podwyższona mutagenność w genach chromosomalnych wynika z rekombinacji, podobnie jak to ma miejsce w przypadku mutacji zlokalizowanych na plazmidzie. Tak więc mechanizm odpowiadający za powstawanie mutacji fazy stacjonarnej, zależnych od rekombinacji, nie jest przypisany wyłącznie plazmidowemu DNA lecz dotyczy różnych miejscach genomu.

W 1998 r. Roth i wsp. [60] zaproponowali model, w którym amplifikacja genów podczas selektywnego wzrostu może prowadzić do pojawiania się mutacji adaptacyjnych bez jakichkolwiek zmian w mutabilności. Model, dla stworzenia którego posłużono się rewersją *lac*⁻ do *Lac*⁺ opiera się na dwóch przesłankach. Po pierwsze zakłada, że zmutowany locus *lac* z zachowaną resztkową funkcją zezwala na wzrost, jeśli ilość jego kopii powiększy się; i po drugie, że prawdziwe zdarzenia rewersji, które dokonują się na drodze replikacji chromosomu, są bardziej prawdopodobne jeśli występuje wiele kopii tego locus. Rycina 2 przedstawia model objaśniający mutagenезę adaptacyjną operonu *lac*. Jeśli resztkowa funkcja *Lac*⁺ ulegnie spontanicznej duplikacji to dojdzie do jej wzmocnienia. Dalsza amplifikacja i selekcja preferująca *Lac*⁺ prowadzi do powstania stabilnego rewertanta *Lac*⁺.

III-5. Odpowiedź SOS

Z badań ostatnich lat wynika, że mutagenезa adaptacyjna podlega pozytywnej i negatywnej regulacji przez system SOS, którego indukcja jest odpowiedzią komórki na stres środowiskowy [61]. W procesie tym bierze udział funkcjonalne białko RecF. Białko to wymagane jest między innymi do indukcji SOS przez takie czynniki, których działanie prowadzi do powstania jednoniciowych fragmentów DNA (ssDNA) [62]. W mutantach *recF* poziom mutacji adaptacyjnych był obniżony i podobny do poziomu występującego w mutancie *lexA3* (Ind⁻), w którym białko LexA, represor regulonu SOS, nie jest cięte w obecności koproteazy RecA*, wobec czego regulon SOS nie podlega indukcji. Brak białka RecF nie powoduje wyższej redukcji mutacji adaptacyjnych w szczepie *lexA3*, a więc w podwójnym mutancie *recFlexA3* nie obserwuje się dalszego obniżenia poziomu mutacji adaptacyjnych czego można by oczekiwać gdyby jedyną funkcją RecF w mutagenезie adaptacyjnej było ułatwianie cięcia białka LexA. Wydaje się więc, że RecF promuje mutagenезę adaptacyjną przez indukcję odpowiedzi SOS, a nie przez rekombinację.

Adaptacyjne mutacje *Lac*⁺ potrzebują również funkcji innych genów regulonu LexA, których ekspresja indukowana jest w czasie odpowiedzi SOS. Chodzi tu przede wszystkim o białko RecA, ze względu na jego udział zarówno w pozytywnej regulacji odpowiedzi SOS jak i w procesie rekombinacji. Ostatnio odkryto kontrolowany przez SOS inhibitor mutagenезy adaptacyjnej PsiB [63]. Białko to kodowane przez gen zlokalizowany na plazmidzie F' inhi-

buje aktywność RecA*. Z kolei inny inhibitor, DinI będący produktem genu chromosomalnego, którego ekspresja regulowana jest przez LexA, hamuje rekombinację i indukcję SOS przez blokowanie koproteazowej aktywności białka RecA. Oba białka DinI i PsiB mogą przyczyniać się do szybkiego powrotu komórki ze stanu indukcji systemu SOS do stanu podstawowego jeśli uszkodzenia DNA zostaną naprawione. Prawdopodobnie DinI słabo konkuruje z PsiB o przyłączenie do RecA. Dane te sugerują, że aktywność RecA* jest krytyczna dla powstawania mutacji adaptacyjnych, w tym sensie, że zarówno podwyższenie jak i obniżenie tej aktywności prowadzi do obniżenia poziomu mutacji adaptacyjnych.

W komórkach *E. coli* pod kontrolą systemu SOS pozostają również geny kodujące polimerazy naprawcze; polimerazę II, kodowaną przez gen *polB*, polimerazę IV, kodowaną przez gen *dinB* i polimerazę V kodowaną przez geny *umuDC*. Wydaje się, że w zależności od typu uszkodzenia DNA i kontekstu sekwencji pol II, pol IV i pol V są zaangażowane w bezbłędną (pol II) lub pozostawiającą błędy (pol IV i pol V) syntezę poprzez miejsce uszkodzenia DNA [64]. Najnowsze badania wskazują, że wspomniane polimerazy również odgrywają rolę w mutagenезie adaptacyjnej przyczyniając się do podwyższenia lub obniżenia poziomu mutacji fazy stacjonarnej w zależności od tego, która z nich bierze udział w procesie naprawy DNA [64, 65].

IV. Znaczenie mutagenезy adaptacyjnej

Pojedyncze komórki stanowiące cały organizm, jak i te budujące tkanki, w warunkach naturalnych występują w fazie stacjonarnej, w której ze względu na ograniczony dostęp składników odżywczych, podziały komórkowe zachodzą bardzo wolno. Mutagenезa mająca miejsce w takich komórkach znacznie odbiega od bardzo dokładnie opisanego procesu, który odbywa się w intensywnie replikujących komórkach fazy logarytmicznej. Ze względu na niedoskonałość modeli badawczych, mechanizmy prowadzące do utrwalenia się zmiany w DNA w postaci mutacji w komórkach spoczynkowych nie są do końca poznane. Wiadomo jednak, że mutagenезa adaptacyjna jest zjawiskiem często występującym i dlatego może mieć ogromny wpływ na genetyczną strukturę populacji. W przeliczeniu na ilość replikowanego DNA tempo powstawania mutantów adaptacyjnych jest dużo wyższe niż mutantów w intensywnie dzielących się komórkach. Ponadto proces ten wpływa na wzrost liczby mutacji korzystnych w danych warunkach, w różnych miejscach genomu.

Dzięki temu utrzymywana jest heterogenność populacji, co niewątpliwie ma wpływ na ewolucyjny rozwój organizmów. Mutacje adaptacyjne powstając w warunkach stresu uwolniają komórkę spod presji selekcyjnej zwiększając jej szansę na przeżycie w warunkach niekorzystnych.

Obserwuje się pewne podobieństwo między mutagenizacją adaptacyjną, a nowotworzeniem. Jednakże w tym drugim przypadku proces ten nie przynosi organizmowi korzyści jak ma to miejsce w przypadku organizmów jednokomórkowych. Pierwszym etapem w powstawaniu nowotworów jest wyzwolenie się komórki z ograniczeń wzrostu. W kolejnym stadium następuje wzrost guza z jednoczesną kumulacją dodatkowych mutacji przy czym najczęściej ich liczba waha się od 4 do 5 [66, 67]. W przypadku nowotworów stwierdzono, że gdyby mutacje powstawały niezależnie z szybkością około $1,4 \times 10^{-10}$ /parę zasad/podział komórki [64], to częstotliwość powstawania nowotworów u ludzi byłaby bardzo niska. Wydaje się oczywiste, że tempo powstawania tych mutacji powinno być zbliżone do tego, które charakteryzuje mutacje adaptacyjne, a badania mutacji adaptacyjnych w komórkach nie dzielących się mogłyby posłużyć jako uproszczony model mutagenезы zachodzącej w komórkach somatycznych wyższych organizmów. Wydaje się więc, że dalsze badania nad mutacjami zachodzącymi w komórkach fazy stacjonarnej pomogą w lepszym zrozumieniu mechanizmów odpowiedzialnych za proces karcinogenezy w komórkach ssaków.

Artykuł otrzymano 13 marca 2003

Zaakceptowano do druku 27 czerwca 2003

V. Piśmiennictwo

- Ryan FJ, (1955) *Genetics* **40**: 726-738
- Ryan FJ, (1959) *J Gen Microbiol* **21**: 30-49
- Ryan FJ, Okada T, Nagata T (1963) *J Gen Microbiol* **30**: 193-199
- Shapiro JA (1984) *Mol Gen Genet* **194**: 79-90
- Cairns J, Overbaugh J, Miller S (1988) *Nature* **335**: 142-145
- Cairns J, Foster PL (1991) *Genetics* **128**: 695-701
- Foster PL (1993) *Annu Rev Microbiol* **47**: 467-504
- Foster PL, Trimachi JM (1994) *Science* **265**: 407-409
- Rosenberg SM, Longerich S, Gee P, Harris RS, (1994) *Science* **265**: 405-407
- Rosenberg SM, Harris RS, Longerich S, Gallo-way AM (1996) *Mutat Res* **350**: 69-76
- Foster PL (1998) *Genetics* **148**: 1453-1459
- Foster PL (1997) *J Bacteriol* **179**: 1550-1554
- Torkelson J, Harris RS, Lombardo MJ, Nagen-dran J, Thulin C, Rosenberg SM (1997) *EMBO J* **16**: 3303-3311
- Hall BG (1995) *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 5669-5673
- Hall BG (1988) *Genetics* **120**: 887-897
- Hall BG (1990) *Genetics* **90**: 673-691
- Hall BG (1993) *J Bacteriol* **175**: 6411-6414
- Nowosielska A, Grzesiuk E (2000) *Acta Biochim Polon* **47**: 459-467
- Bridges BA, Ereira S (1998) *J Bacteriol* **180**: 2906-2910
- Vidal A, Abril N, Pueyo C (1998) *Mutagenesis* **13**: 367-373
- Ames BN, Gold S (1991) *Mutat Res* **250**: 3-16
- Shigenaga MK, Hagen TM, Ames BN (1994) *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**: 10771-10824
- Wood ML, Dizdaroglu M, Gajewski E, Essig-mann JM (1990) *Biochemistry* **29**: 7024-7032
- Shibutani S, Takeshita M, Grollman AP (1991) *Nature* **349**: 431-434
- Cheng KC, Cahill DS, Kasai H, Nishimura S, Loeb LA (1992) *J Biol Chem* **267**: 166-172
- Moriya M, Grollman AP (1993) *Mol Gen Genet* **239**: 72-76
- Bridges BA (1995) *Nature* **375**: 741
- Bridges BA, Sekiguchi, M, Tajiri, T (1996) *Mol Gen Genet* **251**: 352-357
- Benov L, Fridovich I (1996) *Mutat Res* **357**: 231-236
- Burton GW, Ingold KU (1984) *Science* **224**: 569-573
- Tuveson RW, Sandmann G (1993) *Methods Enzymol* **214**: 323-330
- Bridges BA, Timms A (1998) *Mutat Res* **403**: 21-28
- Stahl FW (1988) *Nature* **335**: 112-113
- Jayaraman R (1992) *J Genet* **71**: 23-41
- Reddy M, Gowrishankar J (1997) *Genetics* **147**: 991-1001
- Foster PL (1999) *Annu Rev Genet* **33**: 57-88
- Feng G, Tsui H-CT, Winkler ME (1996) *Bacteriol* **178**: 2388-2396
- Harris RS, Feng G, Ross KJ, Sidhu R, Thulin C, Longerich S, Szigety SK, Winkler ME, Rosen-berg SM (1997) *Genes & Development* **11**: 2426-2437
- Harris RS, Feng G, Ross KJ, Sidhu R, Thulin C, Longerich S, Szigety SK, Hastings PJ, Winkler ME, Rosenberg SM (1999) *Mutat Research* **437**: 51-60
- Foster PL, Cairns J (1992) *Genetics* **131**: 783-789
- Prival MJ, Cebula TA (1992) *Genetics* **132**: 303-310
- Bridges BA (1993) *Mutat Res* **302**: 173-176
- Bull HJ, McKenzie GJ, Hastings PJ, Rosenberg SM (2000) *Genetics* **154**: 1427-1437
- Harris R.S, Longerich S, Rosenberg SM (1994) *Science* **264**: 258-60
- Lombardo MJ, Torkelson J, Bull HJ, McKenzie GJ, Rosenberg SM (1999) *Annu NY Acad Sci* **870**: 275-289
- Kuzminov A (1995) *Mol Microbiol* **16**: 373-384.
- Rosenberg SM, Harris RS, Torkelson J (1995) *Mol Microbiol* **18**: 185-189
- Bridges BA (1997) *Nature* **387**: 557-558
- Seigneur M, Bidnenko V, Ehrlich SD, Michel B (1998) *Cell* **95**: 419-430
- Kogoma T (1997) *Microbiol Mol Biol Rev* **61**: 212-238
- Motamedi MR, Szigety SK, Rosenberg SM (1999) *Genes Dev* **13**: 2889-2903
- Harris RS, Ross KJ, Rosenberg SM (1996) *Genetics* **142**: 681-691
- Rosche WA, Foster PL (1999) *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 6862-6867
- Rosenberg SM, Harris RS, Torkelson J (1995) *Mol Microbiol* **18**: 185-189.
- Rosenberg SM, Thulin C, Harris RS (1998) *Genetics* **148**: 1559-1566
- Foster PL, Trimarchi JM, Maurer RA (1996) *Genetics* **142**: 25-37
- Foster PL, Rosche WA (1999) *Genetics* **152**: 15-30
- Amundsen SK, Taylor AF, Chaudhury AM, Smith GR (1986) *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**: 5558-5562
- Biek DP, Cohen SN (1986) *J Bacteriol* **167**: 594-603
- Andersson DI, Roth JR (1998) *Science* **282**: 1133-1135
- Whitby MC, Ryder L, Lloyd RG (1993) *Cell* **75**: 341-350

- 62 McKenzie GJ, Harris RS, Lee PL, Rosenberg SM (2000) *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 6646-6651
- 63 McGlynn P, Al-Deib AA, Liu J, Mariani KJ, Lloyd RG (1997) *J Mol Biol* **270**: 212-221
- 64 Webb BL, Cox MM, Inman RB (1999) *J Biol Chem* **274**: 15367-15374
- 65 Nowosielska A (2002) Rozprawa doktorska
66. Loeb LA (1991) *Cancer Res* **51**: 3075-3079
- 67 Stein WD (1991) *Adv Cancer Res* **56**: 161-213

S-tiolacja białek jako mechanizm antyoksydacyjny i regulacyjny

Protein S-thiolation as an antioxidative and regulatory mechanism

LIDIA WŁODEK¹, MAŁGORZATA ICIEK²

Spis treści:

- I. Rola tioli w układach biologicznych
- II. Reakcje utleniania grup –SH w białkach
 - II-1. Powstawanie rodników tylowych
 - II-2. Reakcje S-nitrozylacji
 - II-3. Powstawanie kwasów sulfenowych
 - II-4. Nieodwracalne utlenianie grup –SH
- III. Proces S-tiolacji białek, czyli powstawanie mieszanych disiarczków
 - III-1. Wymiana tiolowo-disiarczkowa
 - III-2. Reakcja odwracalnie utlenionych grup –SH białek z niskocząsteczkowymi związkami tiolowymi
 - III-3. Udział glutationu, cysteiny i homocysteiny w reakcjach S-tiolacji białek
- IV. Powstawanie mieszanych disiarczków z białkami jako mechanizm obrony antyoksydacyjnej
- V. Powstawanie mieszanych disiarczków z białkami jako mechanizm regulacyjny
- VI. Podsumowanie

Wykaz stosowanych skrótów: Białko-SSR — mieszane disiarczki z białkami; BFT — białkowe fosfatazy tyrozynowe; γ -GT — gamma-glutamylotranspeptydaza; GSH — zredukowany glutation; GSSG — utleniony glutation; RFA — reaktywne formy azotu; RFT — reaktywne formy tlenu; SNT — S-nitrozotiole; STG — S-transferaza glutationowa

I. Tiole w układach biologicznych

Związki tiolowe chronią komórki przed stresem oksydacyjnym i elektrofilowymi ksenobiotykami. Do najważniejszych niebiałkowych tioli w żywych organizmach należą: tripeptyd glutation oraz aminokwasy cysteina i homocysteina. Glutation (GSH) jest wszechobecnym tiolem występującym w komórkach w wysokich, milimolowych stężeniach. Do najwa-

Contents:

- I. Role of thiols in biological systems
- II. Oxidation reactions of protein –SH groups
 - II-1. Generation of thiyl radicals
 - II-2. S-nitrosylation reactions
 - II-3. Formation of sulfenic acids
 - II-4. Irreversible oxidation of –SH groups
- III. Protein S-thiolation, i.e. formation of mixed disulfides
 - III-1. Thiol-disulfide exchange
 - III-2. Reaction of the reversible oxidized protein –SH groups with lowmolecular thiol compounds
 - III-3. Participation of glutathione, cysteine and homocysteine in the reactions of protein S-thiolation
- IV. Generation of mixed disulfides with proteins as an antioxidant defense mechanism
- V. Formation of mixed disulfides with proteins as a regulatory mechanism
- VI. Conclusions

żniejszych funkcji biologicznych GSH należy detoksykacja wolnych rodników, elektrofilowych ksenobiotyków i kancerogenów oraz utrzymywanie prawidłowej struktury i funkcji białek [1, 2]. Glutation uczestniczy w tak istotnych procesach komórkowych jak: transkrypcja, apoptoza, biosynteza DNA, proliferacja komórek, regulacja aktywności enzymów oraz obrona immunologiczna [3-6]. Obniżenie poziomu GSH w komórkach towarzyszy procesowi starzenia oraz liczным stanom chorobowym, takim jak: cukrzyca, AIDS, nadżerka śluzówki żołądka, katarakta, choroby neurodegeneracyjne, stres oksydacyjny związany z toksycznością ksenobiotyków [7-12]. Cysteina, tiolowy aminokwas, jest czynnikiem redukującym, a także substratem w biosyntezie białek i glutationu (GSH) oraz prekursorem reaktywnej metabolicznie siarki sulfanowej [13]. Powstająca z metioniny homocysteina jest prekursorem cysteiny, a jej podwyższony poziom jest uważany za czynnik ryzyka przedwczesnej arteriosklerozy [14].

Nie tylko niskocząsteczkowe tiole, lecz również reszty cysteiny zlokalizowane na powierzchni białek

¹Dr hab., ²mgr; Instytut Biochemii Lekarskiej Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego, ul. Kopernika 7, 31-034 Kraków, e-mail: mbwlodek@cyf-kr.edu.pl; e-mail: mbmamica@cyf-kr.edu.pl

pełnią funkcje antyoksydacyjne, czego przykładem są albuminy osocza [15]. Reaktywność grup –SH w białkach zależy od wartości pK, czyli od możliwości dysocjacji do jonu tiolanowego. Stopień dysocjacji grup –SH reszt cysteiny w białkach zależy od ładunków i właściwości otaczających struktur białkowych (reakcja 1).



Powyższe równanie reakcji przedstawia równowagę kwasowo-zasadową grupy tiolowej oraz powstawanie rodnika tyłowego odpowiedzialnego za łatwe utlenianie się tioli do disiarczków. Proces ten jest katalizowany przez kationy metali przejściowych i dlatego można go spowolnić poprzez wprowadzenie związków kompleksujących [16].

II. Reakcje utleniania grup –SH w białkach

Odwracalne utlenianie grup –SH reszt cysteiny w białkach, czyli powstawanie rodników tyłowych, kwasów sulfenowych (R-SOH) i S-nitrozotiole (SNT), często stanowi etap pośredni na drodze powstawania mieszanych disiarczków. Natomiast utlenianie grup –SH do kwasów sulfinowych (R-SO₂H) i sulfonowych (R-SO₃H) jest procesem nieodwracalnym, związanym z utratą biologicznych funkcji białek.

II-1. Powstawanie rodników tyłowych

Odwracalne utlenianie grup –SH w białkach może przebiegać jednoelektronowo w reakcjach tioli z wolnymi rodnikami z powstaniem rodników tyłowych, których dimeryzacja prowadzi do powstania disiarczków (reakcje 2 i 3) [17].



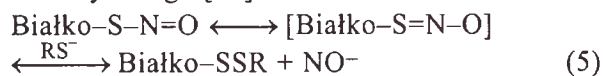
II-2. Reakcje S-nitrozylacji

Białka z udziałem kationu nitrozoniowego (NO⁺) ulegają reakcjom S-nitrozylacji z powstawaniem białkowych S-nitrozotiole (SNT) [18].

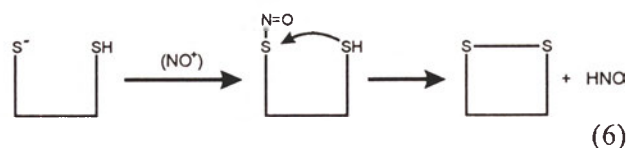


Specyficzność reakcji S-nitrozylacji białek zależy od sekwencji aminokwasów otaczających grupy –SH reszt cysteiny. Proces ten może zatrzymywać się na powstawaniu stabilnych S-nitrozotiole białek. W pewnych jednak przypadkach S-nitrozotiole mogą stanowić etap pośredni na drodze powstawania disiarczków. Może to nastąpić w reakcjach heterolitycznego rozpadu S-nitrozotiole, w których występo-

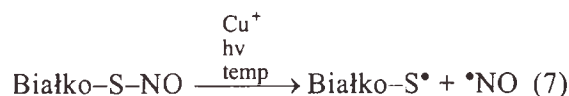
wanie formy rezonansowej umożliwia atak jonem tiolanowym na dodatnio naładowany atom siarki (reakcja 5), co prowadzi do powstania disiarczku i anionu nitroksylowego [19]



W ten sposób poprzez przejściową S-nitrozylację mogą zarówno powstawać mostki disiarczkowe w białkach (reakcja 6) jak i mieszane disiarczki białek z niskocząsteczkowymi tiolami (reakcja 5) [20].

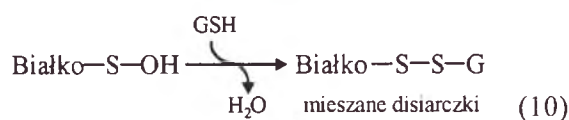
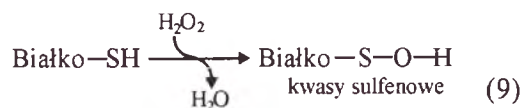


Przekształcanie SNT do disiarczków może być również efektem reakcji homolitycznego rozpadu wiązania pomiędzy azotem i siarką, co następuje pod wpływem jonów metali, temperatury lub promieniowania (reakcje 7 i 8) [21]:



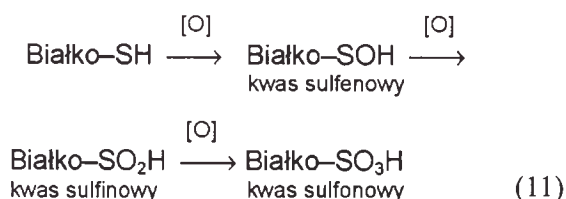
II-3. Powstawanie kwasów sulfenowych

Reszty cysteiny w białkach mogą także ulegać odwracalnemu utlenianiu do nietrwałych kwasów sulfenowych (Białko-S-O-H). Kwasy sulfenowe charakteryzują się silnie elektrofilowym atomem siarki, co umożliwia ich reakcję z tiolami prowadzącą do powstawania mieszanych disiarczków (reakcje 9 i 10). Dlatego przy bliskim sąsiedztwie drugiej grupy –SH w cząsteczce białka lub w obecności niskocząsteczkowych tioli (np. glutationu) kwasy sulfenowe mogą stanowić intermediały na drodze powstawania mostków disiarczkowych w białkach lub prowadzić do powstawania mieszanych disiarczków z białkami [22].



II-4. Nieodwracalne utlenianie grup –SH

Postać zredukowana grup –SH umożliwia związkom tiolowym udział w reakcjach antyoksydacyjnych, katalizy, regulacji, transportu elektronów, a także w utrzymywaniu prawidłowej struktury białek [16,17]. Dlatego homeostaza komórek w znacznym stopniu zależy od biologicznej aktywności grup –SH obecnych w nich tioli. Największym zagrożeniem dla komórek związanym z pojawiającym się stresem oksydacyjnym jest niebezpieczeństwo nieodwracalnego utlenienia grup –SH białek do kwasów sulfinowych i sulfonowych — czyli do maksymalnie utlenionych form reszt cysteiny w białkach [23].



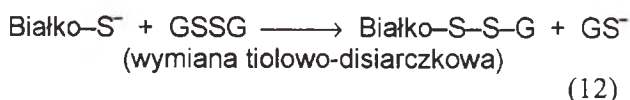
Nieodwracalne utlenianie grup –SH do –SO₂H i –SO₃H (reakcja 11) oznacza utratę wszystkich biologicznych funkcji zależnych od nukleofilowych właściwości grup –SH występujących w cząsteczkach białek. Dlatego w sytuacji niedoboru glutationu w komórkach pojawia się niebezpieczeństwo, że grupy –SH odwracalnie utlenione do rodników tiolowych, S-nitrozotiole, czy kwasów sulfenowych będą w reakcji z tlenem cząsteczkowym lub innymi oksydantami ulegać dalszemu utlenianiu do nieodwracalnie utlenionych kwasów sulfinowych i sulfonowych [23].

III. Proces S-tiolacji białek czyli powstawania mieszanych disiarczków białek

Powstawanie i redukcja wiązań disiarczkowych w znacznej mierze zależy od dostępności donorów i akceptorów elektronów, o czym decyduje potencjał redoks środowiska. Tak więc zmiana stosunku tirole/disiarczki, czyli zmiana potencjału redoks tioli w komórce lub w osoczu, będzie wywierać znaczący wpływ na strukturę i funkcje białek. Tirole białkowe mogą w reakcjach z tiolami niskocząsteczkowymi tworzyć mieszane disiarczki w reakcjach zwanych S-tiolacją białek. Przyjmuje się, że proces S-tiolacji białek może przebiegać poprzez dwa odmienne mechanizmy: 1) wymianę tiolowo-disiarczkową [24], oraz 2) jako efekt reakcji odwracalnie utlenionych grup –SH białek z niskocząsteczkowymi związkami tiolowymi [25].

III-1. Wymiana tiolowo-disiarczkowa

Niskocząsteczkowe disiarczki takie jak utleniony glutation (GSSG), cystyna czy cystamina są łagodnymi czynnikami utleniającymi, które mogą utleniać do mieszanych disiarczków zarówno nisko- jak i wysokocząsteczkowe tirole. O reaktywności tioli w reakcjach wymiany tiolowo-disiarczkowej decyduje wartość pK grup tiolowych, czyli reaktywność ta zależy od dysocjacji grup –SH do nukleofilowego anionu tiolanowego –S[–]. Pod wpływem silnego stresu oksydacyjnego wzrasta wewnątrzkomórkowa pula utlenionego glutationu (GSSG), czemu może towarzyszyć wzrost poziomu mieszanych disiarczków białek, czyli następuje tak zwana glutationylacja białek (reakcja 12) [26].



Powstawanie na tej drodze mieszanych disiarczków jest jednak możliwe tylko przy odpowiednio wysokich stężeniach GSSG, co przy panującym w komórkach wysokim stosunku GSH/GSSG w znacznym stopniu ogranicza ten proces. W warunkach *in vivo* tylko nieliczne białka enzymatyczne posiadają wartości K_{oks} pozwalające na S-tiolację poprzez mechanizm wymiany tiolowo-disiarczkowej [27]. Dlatego powstawanie mieszanych disiarczków na drodze wymiany tiolowo-disiarczkowej z przyczyn termodynamicznych może przebiegać w komórkach tylko w bardzo ograniczonym zakresie.

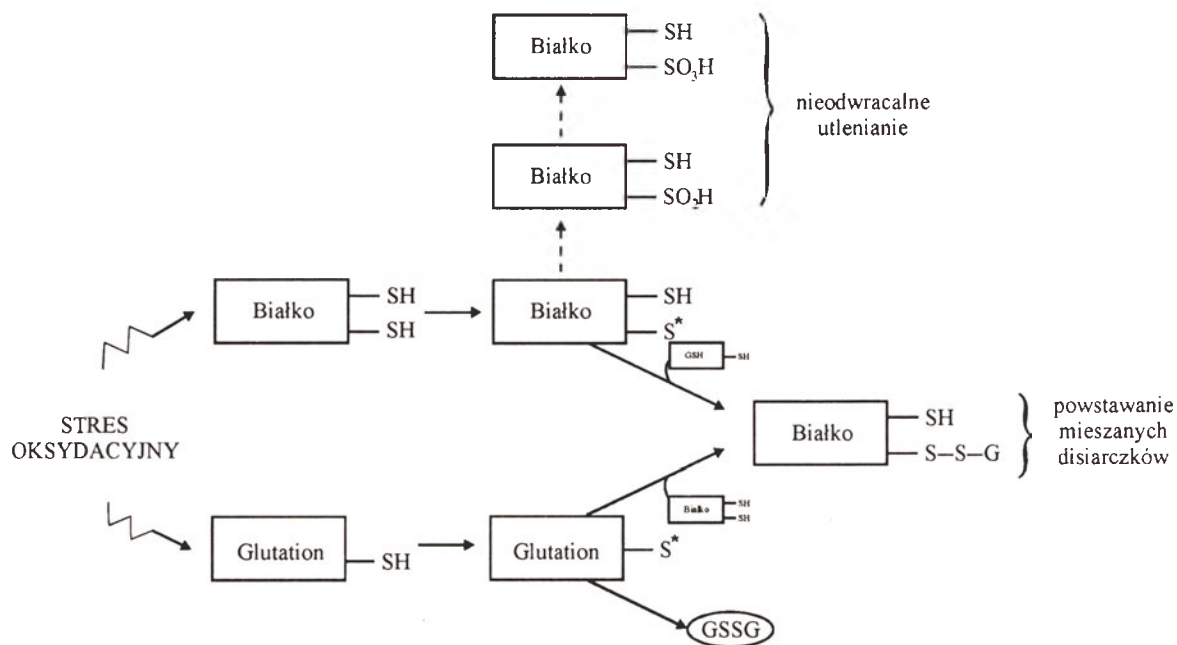
III-2. Reakcja odwracalnie utlenionych grup –SH białek z niskocząsteczkowymi związkami tiolowymi

Zaobserwowano, że S-tiolacja białek może być inicjowana przez reaktywne formy tlenu (RFT) i następuje to bez widocznego wzrostu poziomu GSSG w komórkach [28]. W tym mechanizmie S-tiolacji oksydant najpierw reaguje bezpośrednio z grupami –SH białek, w wyniku czego przejściowo powstają odwracalnie utlenione reszty cysteiny, czyli białkowe rodniki tiolowe, S-nitrozotiole lub kwasy sulfenowe (reakcje 2, 4 i 9). Następnie takie reaktywne postacie tioli mogą reagować z niskocząsteczkowymi tiolami, co prowadzi do powstawania mieszanych disiarczków (reakcje 3, 5, 6 i 10).

Możliwa jest również sytuacja odwrotna, kiedy pod wpływem czynnika prooksydacyjnego najpierw

będą powstawać częściowo utlenione aktywne postacie niskocząsteczkowych tioli np. GSH (takie jak: GS^{*}, GSOH, GSNO), których reakcje z grupami –SH białek będą następnie prowadzić do powstawania mieszanych disiarczków białek [29] (Ryc. 1).

siarczków białek z cysteiną (białko–S–S–cysteina), czy z homocysteiną (białko–S–S–homocysteina) [31]. W badaniach *in vitro* wykazano, że cysteina poprzez wytwarzanie mieszanych disiarczków może chronić inkubowane z H₂O₂ białka soczewki oka



Ryc. 1. S-tiolacja jako mechanizm chroniący reszty cysteiny w białkach przed nieodwracalnym utlenianiem grup –SH do –SO₂H i –SO₃H. Pod wpływem stresu oksydacyjnego powstają aktywne intermediały białek (rodniki tyłowe Białko-S^{*}, kwasy sulfenowe Białko-S-O-H lub S-nitrozotiole (Białko-SNO), których reakcje z glutationem (GSH) lub innymi tiolami prowadzą do powstawania mieszanych disiarczków. Możliwa jest również analogiczna reakcja z GSH do aktywnych intermediatów glutationu (GS^{*}), których reakcje z grupami –SH białek mogą także prowadzić do powstawania mieszanych disiarczków białek lub utlenionego glutationu (GSSG).

III-3. Udział glutationu, cysteiny i homocysteiny w reakcjach S-tiolacji

Przyjmuje się, że S-tiolacja białek, czyli powstawanie mieszanych disiarczków, jest mechanizmem chroniącym grupy –SH białek przed niebezpieczeństwem nieodwracalnego utleniania, które wiąże się z utratą biologicznych funkcji tych cząsteczek [25]. Glutation jest niskocząsteczkowym tiolem występującym w najwyższym stężeniu w komórkach, dlatego reakcje S-tiolacji białek najczęściej przebiegają z jego udziałem. Oznacza to zatem, że powstawanie mieszanych disiarczków białek z GSH może stanowić kolejną możliwość antyoksydacyjnego działania tego tiolowego tripeptydu, na którą do tej pory nie zwracano większej uwagi. Komórki charakteryzują się wysokim stosunkiem tiole/disiarczki, wynoszącym około 100. Ten wysoce redukujący status tiolowo-disiarczkowy zapewnia wysokie stężenie GSH w komórkach. Dlatego najczęściej występującym produktem S-tiolacji białek będą mieszane disiarczki białek z GSH (białko–S–S–glutation) [30]. Niezależnie jednak od tego mogą również przebiegać reakcje z udziałem innych tioli, czego dowodem jest obecność w komórkach mieszanych di-

przed nieodwracalnym utlenianiem do –SO₃H i –SO₂H [32]. Ponadto dla cysteiny jako cząsteczki mniejszej niż GSH mogą być dostępne w białkach miejsca, do których nie będzie mieć wstępu większa cząsteczka GSH. Dlatego S-tiolacja białek z udziałem różnych tioli może przebiegać w odmiennych miejscach lub też dotyczyć zupełnie innych białek.

Powstawanie mieszanych disiarczków białek z niskocząsteczkowymi tiolami ma również swój niewątpliwie wpływ na możliwość powstawania disiarczków białko–białko czyli na proces agregacji białek. Zauważono, że S-tiolacji białek soczewki oka z udziałem cysteiny równocześnie towarzyszy powstawanie disiarczków białko–S–S–białko [33].

IV. Powstawanie mieszanych disiarczków z białkami jako mechanizm obrony antyoksydacyjnej

W komórkach wątroby część cytoplazmatycznego GSH jest związana z grupami –SH białek, czyli występuje w postaci mieszanych disiarczków. Zauważono także, że w wątrobie stężenia mieszanych disiarczków białek z GSH wykazują przeciwny

rytm dzienny w stosunku do tego, jaki wykazuje wolny GSH [34]. Mieszane disiarczki białek z glutationem są również uważane za sposób magazynowania tego tripeptydu, czyli stanowią pulę GSH, z której można korzystać w momencie zapotrzebowania. Glutation w komórkach bierze udział w reakcjach detoksykacyjnych i antyoksydacyjnych oraz zapewnia prawidłowy potencjał redoks. Proces S-tiolacji białek stanowi kolejną możliwość antyoksydacyjnego działania tioli, która do tej pory nie wzbudzała większego zainteresowania. Taki mechanizm osłaniającego działania glutationu w stosunku do grup –SH białek wymaga jednak odpowiednio wysokiej komórkowej puli zredukowanego GSH. Oznacza to, że w sytuacjach, kiedy następuje w komórkach spadek stężenia GSH, co towarzyszy licznym stanom patologicznym, również ten rodzaj obrony antyoksydacyjnej związanej z glutationem ulega ograniczeniu. Przy niedoborze GSH, co następuje pod wpływem stresu oksydacyjnego, częściowo utlenione, aktywne grupy –SH białek mogą ulegać dalszemu, nieodwracalnemu utlenianiu z powstaniem białkowych kwasów sulfenowych –SO₂H i sulfinowych –SO₃H (reakcja 11). Obecność grup –SO₂H jak i –SO₃H będących efektem oksydacyjnego uszkodzenia białek stwierdza się w preparatach wielu oczyszczonych białek [35]. S-tiolacja białek będzie zatem procesem chroniącym grupy –SH przed nieodwracalnym utlenianiem i nieodwracalną utratą biologicznej aktywności białek. Proces ten jest możliwy tylko przy fizjologicznych stężeniach GSH lub innych tioli.

V. Powstawanie mieszanych disiarczków z białkami jako mechanizm regulacyjny

W warunkach oksydacyjnych w komórkach obserwuje się przejściową akumulację mieszanych disiarczów z białkami, co stanowi jeden z markerów stresu oksydacyjnego, a równocześnie obronę przed nieodwracalnym utlenianiem grup –SH [36]. Okazuje się, że powstawanie mieszanych disiarczów z białkami to również sposób regulacji biologicznej aktywności białek. Odwracalne utlenianie grup –SH białek do mieszanych disiarczów stanowi kolejny mechanizm transdukcji sygnałów w komórkach [37]. Grupy –SH reszt cysteiny białek mogą występować zarówno w postaci w pełni zredukowanej jak i w postaci częściowo i odwracalnie utlenionej (kwasy sulfenowe, S-nitrozotiole i mieszane disiarczki), co stwarza możliwość precyzyjnej regulacji biologicznej aktywności tych cząsteczek. S-tiolacja białek to odwracalna, kowalencyjna modyfikacja cząsteczek

białek w komórkach będąca efektem działania reaktywnych form tlenu i azotu (RFT i RFA). Reaktywne postacie tlenu i azotu, jak wiadomo, pełnią w komórkach funkcje regulacyjne [38], co może również następować poprzez reakcje S-tiolacji prowadzące do powstawania mieszanych disiarczów z białkami. Nieustannie wzrasta ilość doniesień wskazujących, że S-tiolacja białek jest odpowiedzią na sygnały, jakie niosą RFT czy RFA [39]. Dlatego odwracalne reakcje S-tiolacji białek należy postrzegać jako redoksowy mechanizm regulacji procesów komórkowych.

Zarówno regulacyjne jak i antyoksydacyjne znaczenie procesu S-tiolacji białek ściśle wiąże się z odwracalnością tych reakcji czyli z procesem detiolacji. Skuteczność zarówno strategii obronnej jak i regulacyjnej reakcji S-tiolacji białek zależy również od sprawnie działającego redukującego mechanizmu detiolacji. Będą to reakcje przebiegające z udziałem: tiolotransferaz, glutaredoksyny i tioredoksyny [40,41]. Zauważono, że białka soczewki oka inkubowane z 0,5 mM roztworem H₂O₂ posiadają 15-krotnie podwyższony poziom mieszanych disiarczów z białkami (Białko–S–S–R), który w środowisku pozbawionym H₂O₂ szybko obniża się, co wskazuje na sprawnie działający proces detiolacji [42]. Podobną sytuację zaobserwowano także w komórkach śródbłonna naczyń królika [43]. GSH jest tiolem, który odgrywa istotną rolę zarówno w powstawaniu mieszanych disiarczów z białkami jak i w reakcjach redukcyjnej regeneracji grup –SH, w których pełni rolę kofaktora. Możliwość następujących po sobie procesów S-tiolacji i detiolacji białek, podobnie jak fosforylacji i defosforylacji, będzie miała decydujące znaczenie zarówno w przekazywaniu sygnałów komórkowych jak i w obronie antyoksydacyjnej. S-tiolacja białek z udziałem GSH została poznana w przypadku różnych białek i w różnych typach komórek i jest uważana za proces przekazywania sygnałów komórkowych w odpowiedzi na stres oksydacyjny. Coraz bardziej wrasta liczba opisanych enzymów, których aktywność jest regulowana poprzez powstawanie mieszanych disiarczów [37, 43]. Przykładem może być S-transferaza glutationowa (STG)-enzym, który w procesie indukowanej przez H₂O₂ S-tiolacji ulega aktywacji [27]. Oznacza to, że enzym związany z detoksykacyjnym działaniem GSH może w warunkach stresu oksydacyjnego z udziałem GSH ulegać aktywacji w reakcji S-glutationylacji [27]. Natomiast przykładem enzymu, którego aktywność w procesie S-glutationylacji ulega zahamowaniu, jest γ -glutamylotranspeptydaza (γ -GT) [44]. Enzym ten odgrywa kluczową rolę w cyklu γ -glutamylowym, w którym zewnątrzkomórkowa

biodegradacja GSH dostarcza cysteiny koniecznej dla wewnątrzkomórkowej biosyntezy GSH [45]. Stwierdzono, że utrata aktywności γ -GT jest związana z przejściową S-tiolacją grupy $-SH$ w centrum aktywnym enzymu. Przypuszcza się, że może to być następstwem powstawania nadtlenu wodoru (H_2O_2) jako produktu ubocznego działania γ -GT [45].

Stwierdzono także, że w obecności glutationu pod wpływem toksycznego nadtlenoazotynu ($ONOO^-$) może następować S-tiolacja będąca przyczyną odwracalnego zahamowania aktywności ATP-azy [46]. Z kolei efektem przejściowej S-transnitrozylacji pod wpływem S-nitrozoglutationu, a następnie powstawania mieszanych disiarczków z GSH jest zahamowanie aktywności katepsyny K [47].

Również enzymy regulujące stopień fosforylacji białek w komórkach mogą podlegać odwracalnej, redoksowej regulacji związanej z procesem S-tiolacji [48]. Następuje to poprzez S-glutationylację i odwracalne hamowanie aktywności białkowych fosfataz tyrozynowych (BFT) [49]. Aktywność białkowej fosfatazy tyrozynowej 1B (BFT-1B) ulega zahamowaniu w wyniku utlenienia Cys_{215} do kwasu sulfenowego, który w reakcji z GSH przekształca się w stabilne mieszane disiarczki, a glutaredoksyna reaktywuje enzym [48, 50]. Istnieją również eksperymentalne dowody, że S-glutationylacja BFT może być następstwem akumulacji w komórkach disiarczku glutationu (GSSG) [51]. Ze względu na znaczne podobieństwa strukturalne w budowie centrów aktywnych różnych izoenzymów białkowych fosfataz tyrozynowych (BFT) można przypuszczać, że S-glutationylacja tych enzymów może stanowić ogólny mechanizm poprzez który regulowany jest stopień fosforylacji białek w komórkach.

Również procesy regulacyjne związane z ubikwitylacją białek podlegają komórkowej kontroli redoksowej związanej z reakcjami S-tiolacji. Ubikwityna jest małym białkiem, odgrywającym ważną rolę w naznaczaniu białek, które mają ulec proteolitycznej biodegradacji przez proteosomy [52]. W przyłączeniu ubikwityny do białek biorą udział 3 enzymy oznaczone jako: E_1 , E_2 i E_3 . Wykazano, że w wyniku reakcji S-glutationylacji w centrach aktywnych następuje odwracalne zahamowanie aktywności enzymów E_1 i E_2 [53, 54]. Oznacza to, że mechanizm S-glutationylacji może również chronić reperycyjne i sygnałowe funkcje enzymów ubikwitylujących przed nieodwracalną inaktywacją oksydacyjną.

Powszechnie wiadomo, że zmiany w poziomie RFT w komórkach wpływają na ekspresję genów w

komórkach [55]. Stwierdzono, że zahamowanie aktywności czynników transkrypcyjnych takich jak: Jun/Fos, NFB, czynnik nuklearny 1, Sp-1 i P_{53} następuje poprzez utlenianie grup tiolowych reszt cysteiny do kwasów sulfenowych przekształcanych następnie do mieszanych disiarczków [56, 57]. Dowodem potwierdzającym S-tiolację jest ścisła zależność aktywności czynników transkrypcyjnych od panującego w komórkach stosunku GSH/GSSG, a także możliwość przywracania ich aktywności pod wpływem glutaredoksyny [58, 59]. Oznacza to, że powstawanie mieszanych disiarczków może prowadzić do odwracalnej utraty aktywności czynników transkrypcyjnych. Tym samym pojawia się sugestia, że S-glutationylacja może stanowić mechanizm transdukcji sygnałów, w którym stres oksydacyjny może powodować represję ekspresji genów.

Wszystko to podkreśla, jak niezwykle ważną rolę odgrywają w komórkach tiole, w tym szczególnie zredukowana postać glutationu (GSH). Doświadczenia *in vitro* prowadzone na oczyszczonych preparatach białek wykazują, że spadek poziomu GSH w środowisku natychmiast prowadzi do powstawania nieodwracalnie utlenionych grup $-SH$ w cząsteczkach tych białek. Przykładem takim jest anhydraza węglanowa III, w przypadku której stwierdzono, że spadek stężenia GSH w środowisku prowadzi zarówno do obniżenia poziomu mieszanych disiarczków z GSH, jak i do wzrostu nieodwracalnie utlenionych grup $-SH$ [23]. W fizjologicznych warunkach zarówno w komórkach jak i w przestrzeni pozakomórkowej (osoczu) znaczna część tioli, takich jak GSH, cysteina i homocysteina występuje w postaci mieszanych disiarczków z białkami. W osoczu zdrowego człowieka zawartość frakcji związanej z białkami wynosi odpowiednio 19% dla glutationu, 65% dla cysteiny i 70% dla homocysteiny [60]. Oznacza to, że S-tiolacja i detiolacja białek jest cyklicznym procesem, który w warunkach fizjologicznych spełnia rolę antyoksydacyjną i regulacyjną. Nieodwracalne utlenianie reszt cysteiny w białkach prowadzi do zakłócenia transdukcji sygnałów, co obserwuje się w procesie starzenia oraz w chorobach nowotworowych i innych stanach patologicznych [49, 61].

VI. Podsumowanie

S-tiolacja białek czyli proces powstawania mieszanych disiarczków z białkami jest następstwem stresu oksydacyjnego występującego w komórkach. Stanowi to ważny mechanizm zarówno o znaczeniu antyoksydacyjnym jak i regulacyjnym, na który do tej pory nie zwracano większej uwagi. Powstawanie

mieszanych disiarczoków białek należy postrzegać jako jeszcze jeden mechanizm antyoksydacyjnego działania tioli polegający na przejściowym osłanianiu grup –SH w cząsteczkach białek przed nieodwracalnym utlenieniem do –SO₂H i –SO₃H, powodującym nieodwracalną utratę biologicznych funkcji.

Odwracalne utlenienie grup –SH białek do mieszanych disiarczoków może również stanowić mechanizm transdukcji sygnałów w komórkach [38]. Ponieważ grupy –SH białek mogą występować zarówno w postaci w pełni zredukowanej jak i w postaci częściowo i odwracalnie utlenionej (rodniki tyłowe, kwasy sulfenowe, S-nitrozotiole oraz mieszane disiarczki) stwarza to możliwość regulacji biologicznej aktywności tych cząsteczek. S-tiolacja białek to odwracalna, kowalencyjna modyfikacja cząsteczek białek będąca efektem działania reaktywnych form tlenu i azotu. W procesie S-tiolacji białek następuje zatem integracja efektów oksydacyjnych i nitrozy-lujących z obroną antyoksydacyjną oraz z transduk-cją sygnałów w komórkach.

Artykuł otrzymano 27 stycznia 2003

Zaakceptowano do druku 3 czerwca 2003

Piśmiennictwo

1. Włodek L (2003) W: Włodek L (red) *Tiole w warunkach fizjologicznych, patologicznych i w terapii*. Wyd. Uniwersytetu Jagiellońskiego, str. 111-160
2. Lorenc-Koci E (2003) W: Włodek L (red) *Tiole w warunkach fizjologicznych, patologicznych i w terapii*. Wyd. Uniwersytetu Jagiellońskiego, str. 163-212
3. Shaw CA (1998) W: Shaw CA (red) *Glutathione in the nervous system*. Taylor and Francis, Washington, str. 3-23
4. Cotgreave IA, Gerdes RG (1998) *Biochem Biophys Res Commun* **242**: 1-9
5. Choi J, Liu RM, Kundu RK, Sangiorgi F, Wu W, Maxson R, Forman HJ (2000) *J Biol Chem* **275**: 3693-3698
6. Nuttall SL, Martin U, Sinclair AJ, Kendall JJ (1998) *Lancet* **351**: 645-646
7. Kharb S (2000) *Clin Chim Acta* **294**: 179-183
8. Lang CA, Mills BJ, Mastropaolo W, Liu MC (2000) *J Lab Clin Med* **135**: 402-407
9. Hadi Yasa M, Kacmaz M, Serda Ozturk M, Durak J (1999) *Hepato-Gastroenterology* **46**: 2460-2463
10. Sian J, Dexter DT, Lees AJ, Daniel S, Agid Y, Yavoy-Agid F, Jenner P, Marsden CD (1994) *Ann Neurol* **36**: 348-355
11. Pirmohamed M, Williams D, Tingle MD, Barry M, Khoo S, O'Mahony C, Wilkins EG, Breckenridge AM, Park BK (1996) *AIDS* **10**: 501-507
12. Samiec PS, Drews-Botsch C, Flagg EW, Kurtz JC, Sternberg PJ, Reed RL, Jones DP (1998) *Free Rad Biol Med* **24**: 699-704
13. Cooper AJL (1983) *Ann Rev Biochem* **52**: 187-222
14. Brzezińska A, Balińska M (2000) *Post Biol Komórki* **27**: 81-96
15. Lee H, Cha MK, Kim IH (2000) *Arch Biochem Biophys* **380**: 309-318
16. Włodek L (2002) W: Włodek L (red) *Biotiole w warunkach fizjologicznych, patologicznych i w terapii*. Włodek L (red) Wyd. Uniwersytetu Jagiellońskiego str. 17-32
17. Włodek L (2002) *Polish J Pharmacol* **54**: 215-223
18. Gaston B (1999) *Biochim Biophys Acta* **1411**: 323-333
19. Hughes MN (1999) *Biochim Biophys Acta* **1411**: 263-272
20. Le M, Zhang H, Means GH (1997) *Bioorg Med Chem Lett* **7**: 1393-1398
21. Al-Sa'doni M, Ferro A (2000) *Clin Sc* **98**: 507-520
22. Claiborne A, Miller H, Parsonage D, Ross RP (1993) *FASEB J* **7**: 1483-1490
23. Lii CK, Chai YC, Zhao W, Thomas JA, Hendrich S (1994) *Arch Biochem Biophys* **308**: 231-239
24. Gilbert HF (1984) *Methods Enzymol* **107**: 330-351
25. Thomas JA, Poland B, Honzatko R (1995) *Arch Biochem Biophys* **319**: 1-9
26. Droge W, Schulze-Osthoff K, Mihm S, Galter D, Schenk H, Eck HP, Roth S, Gmunder H (1994) *FASEB J* **8**: 1131-1138
27. Dafre AL, Sies H, Akerboom T (1996) *Arch Biochem Biophys* **332**: 288-294
28. Chai YC, Ashraf SS, Rokutan K, Johnston RB Jr, Thomas JA (1994) *Arch Biochem Biophys* **310**: 273-281
29. Ji Y, Akerboom TP, Sies H, Thomas JA (1999) *Arch Biochem Biophys* **362**: 67-78
30. Chai YC, Hendrich S, Thomas JA (1994) *Arch Biochem Biophys* **310**: 264-272
31. Mallis RJ, Thomas JA (2000) *Arch Biochem Biophys* **383**: 60-69
32. Cui XL, Lou MF (1993) *Exp Eye Res* **57**: 157-167
33. Lou MF (2000) *J Ocular Pharmacol Ther* **16**: 137-148
34. Isaacs J, Binkley F (1977) *Biochim Biophys Acta* **497**: 192-204
35. Cabiscoll E, Levine RL (1995) *J Biol Chem* **270**: 14742-14747
36. Mallis RJ, Hamann MJ, Zhao W, Zhang T, Hendrich S, Thomas JA (2002) *Biol Chem* **383**: 649-662
37. Klatt P, Lamas S (2000) *Eur J Biochem* **267**: 4928-4944
38. Metodiewa D, Koska C (2000) *Neurotoxicity Res* **1**: 197-233
39. Thomas JA, Mallis RJ (2001) *Exp Geront* **36**: 1519-1526
40. Jung CH, Thomas JA (1996) *Arch Biochem Biophys* **335**: 61-72
41. Gravina SA, Mielal JJ (1993) *Biochemistry* **32**: 3368-3376
42. Wang GM, Wu F, Raghavachari N, Reddan JR (1998) *Exp Eye Res* **66**: 447-485
43. Schinina ME, Carlini P, Polticelli F, Zappacosta F, Bossa F, Calabrese L (1996) *Eur J Biochem* **237**: 433-439
44. Dominici S, Valentini M, Maellaro E, Del Bello B, Paolicchi A, Lorenzini E, Tongiani R, Comporti M, Pompella A (1999) *Free Rad Biol Med* **27**: 623-635
45. Griffith OW, Bridges RJ, Meister A (1978) *Proc Natl Acad Sci USA* **75**: 5405-5408
46. Viner RI, Williams TD, Schoneich C (1999) *Biochemistry* **38**: 12408-12415
47. Percival MD, Quillet M, Campagnolo C, Claveau D, Li C (1999) *Biochemistry* **38**: 13574-13583
48. Denu JM, Tanner KG (1998) *Biochemistry* **37**: 5633-5642
49. Barrett WC, DeGnore JP, Keng YF, Zhang ZY, Yim MB, Chock PB (1999) *J Biol Chem* **274**: 34543-34546
50. Barrett WC, DeGnore JP, Konig S, Fales HM, Keng YF, Zhang ZY, Yim MB, Chock PB (1999) *Biochemistry* **38**: 6699-6705
51. Deg'Innocenti D, Caselli A, Rosati F, Marzocchini R, Manao G, Gamici G, Ramponi G (1999) *IUBMB Life* **48**: 505-511
52. Kornitzer D, Ciechanover A (2000) *J Cell Physiol* **182**: 1-11
53. Jahngen-Hodge J, Obin MS, Gong X, Shang F, Nowel R, Gong J, Abasi H, Blumberg J, Taylor A (1997) *J Biol Chem* **272**: 28218-28226
54. Obin M, Shang F, Gong X, Handelsman G, Blumberg J, Taylor A (1998) *FASEB J* **12**: 463-499
55. Allen RG, Tresini M (2000) *Free Rad Biol Med* **28**: 463-499
56. Morel Y, Barouki R (1999) *Biochem J* **342**: 481-496

57. Abate C, Patel L, Rauscher FJ, Curran T (1990) *Science* **249**: 1157-1161
58. Bandyopadhyay S, Starke DW, Mieczal JJ, Gronostajski RM (1998) *J Biol Chem* **273**: 392-397
59. Klatt P, Molina EP, DeLacoba MG, Padilla CA, Martinez Galesteo E, Barcena JA, Lamas S (1999) *FASEB* **13**: 1481-1490
60. Bald E (2003) W: Włodek L (red) *Tiole w warunkach fizjologicznych, patologicznych i w terapii*. Wyd. Uniw. Jagiellońskiego, str. 333-354
61. Navarro J, Obrador E, Carretero J, Petschen I, Avino J, Perez P, Estrela JM (1999) *Free Rad Biol Med* **26**: 410-418

Znaczenie polimorfizmów genów transferaz glutationowych człowieka

The significance of polymorphisms in the human glutathione transferase genes

CHRISTOS KARGAS¹, ZOFIA WALTER²

Spis treści:

- I. Ogólna charakterystyka i nazewnictwo transferaz glutationowych (GST)
- II. Funkcje i znaczenie wybranych GST
- III. Znaczenie polimorfizmów genów *GSTA*
- IV. Znaczenie polimorfizmów genu *GSTP1*
- V. Znaczenie polimorfizmów genów *GSTM*
- VI. Znaczenie polimorfizmów genów *GSTT*
- VII. Uwagi końcowe

Wykaz stosowanych skrótów: AC (ang. *Adenocarcinoma*) — rak gruczolakowaty; CDNB — 1-chloro-2,3-dinitrobenzen; *DDCT* — gen kodujący tautomerazę D-dopachromu; dopachrom — 2-karboksy-2,3-dihydroindolo-5,6-chinon; GSH — glutation (forma zredukowana); GST — transferaza(y) glutationowa(e); HNE — 4-hydroksynonenal; kpz — tysiąc par zasad; pz — para zasad; RA — kwas retynolowy; RA-RE — element odpowiedzi na kwas retynolowy; SCC (ang. *Squamous Cell Carcinoma*) — rak łuskowaty; YY1 — jeden z białkowych czynników hamujących transkrypcję

I. Ogólna charakterystyka i nazewnictwo transferaz glutationowych (GST)

Transferazy glutationowe (GST) [EC 2.5.1.18] stanowią grupę enzymów wielofunkcyjnych. Katalizują tworzenie koniugatów GSH zarówno z wieloma związkami endogennymi, jak i ksenobiotykami, wykazując aktywność glutationowej peroksydazy niezależnej od selenu i aktywność izomeraz dla 3-ketokwasów. Ponadto biorą udział w biosyntezie leukotrienów i w metabolizmie kwasu arachidonowego, uczestniczą w syntezie hemowych grup prostetycznych dla apocytochromu P-450, wykazując aktyw-

Contents:

- I. General characterization and the nomenclature of glutathione transferases (GSTs)
- II. Function and significance of selected GSTs
- III. Significance of polymorphisms in *GSTA* genes
- IV. Significance of polymorphisms in *GSTP1* gene
- V. Significance of polymorphisms in *GSTM* genes
- VI. Significance of polymorphisms in *GSTT* genes
- VII. Final remarks

ność peroksydaz i izomeraz prostaglandyn, a także funkcjonują jako nieenzymatyczne białka transportujące.

GST występują u wszystkich zbadanych organizmów w postaci licznych izoenzymów. Ekspresja różnych izoenzymów GST jest tkankowo specyficzna i zależna od wieku, płci, działania ksenobiotyków oraz stanów chorobowych. GST dzieli się na klasy w zależności od ich właściwości fizykochemicznych. Enzymy te są zbudowane z podjednostek, a podjednostki poszczególnych klas GST są kodowane przez odrębną rodzinę genową [1-3].

Nazewnictwo enzymów i genów GST przyjęte w niniejszej pracy jest zgodne z propozycjami jego ujednolicenia zgłoszonymi przez Manner i wsp. [3], Sheehan i wsp. [4] oraz najnowszymi zaleceniami Komitetu Nazewnictwa Genów (*Gene Nomenclature Committee*: <http://www.gene.ucl.ac.uk/nomenclature/>). W piśmiennictwie stosuje się do tej pory różnorodne nazewnictwo klas GST. We wszystkich przypadkach, gdy w cytowanej pracy występowały nazwy sformowane według innych zasad, w naszej pracy zostały ujednolicone zgodnie z wymienionymi powyżej zaleceniami. Wyróżnione klasy oznaczano literami greckimi, a w pisowni skrótów enzymów i genów użyto odpowiadające im duże litery łacińskie z wyjątkiem klasy θ , którą zamiast litery Q, oznacza się zwyczajowo literą T, na ogół za-

¹Mgr, ²prof. dr hab.; Katedra Genetyki Molekularnej, Uniwersytet Łódzki, ul. Banacha 12/16, 90-237 Łódź; chkargas@hotmail.com

rezerwowaną dla greckiej litery τ ([http:// www.gene.ucl.ac.uk/nomenclature/](http://www.gene.ucl.ac.uk/nomenclature/)).

Tkanki ssaków zawierają w cytosolu komórkowym co najmniej 7 różnych klas transferaz: α (A), μ (M), π (P), θ (T), σ (S), ζ (Z) i ω (O) [5- 11]. W matriks mitochondrialnej komórek ssaków znaleziono jeszcze jedną unikatową klasę rozpuszczalnych GST nazwaną κ (K) [12-15]. Wszystkie rozpuszczalne GST są dimerami, a połączone z błonami GST frakcji mikrosomalnej (MGST) są trimerami [16]. Opisano do tej pory pięć mikrosomalnych transferaz glutationowych: MGST1, MGST2, MGST3, białko aktywowane przez S-lipogenezę (FLAP) oraz syntazę leukotrienu C4.

W tabeli 1 zestawiono poznane GST człowieka, ich klasyfikację oraz lokalizację genów w genomie.

Tabela1

Transferazy glutationowe (GST) człowieka

GST frakcji cytosolowej				GST frakcji mikrosomalnej		
Klasa	Enzymy	Geny	Lokalizacja w genomie	Enzymy	Geny	Lokalizacja w genomie
α	hGSTA1a-1a	<i>GSTA1A</i>	Wszystkie geny <i>GSTA</i> występują w klasterze w pozycji 6p12	MGST1-1-1	<i>MGST1</i>	12p13.1-p13.2
	hGSTA1a-1b	<i>GSTA1A, GSTA1B</i>				
	hGSTA1b-1b	<i>GSTA1B</i>				
	hGSTA1a-2	<i>GSTA1A, GSTA2</i>				
	hGSTA1b-2	<i>GSTA1B, GSTA2</i>				
	hGSTA2-2	<i>GSTA2</i>				
	hGSTA4-4	<i>GSTA3</i>				
μ	hGSTM1a-1a	<i>GSTM1A</i>	Geny <i>GSTM1</i> (A lub B) <i>GSTM2</i> , <i>GSTM4</i> i <i>GSTM5</i> występują w klasterze w pozycji 1p13 Gen <i>GSTM3</i> (A lub B) albo w chromosomie 1 poniżej 3'-końca <i>GSTM5</i> albo w chromosomie 3	MGST2-2-2	<i>MGST2</i>	4q28-q31
	hGSTM1a-1b	<i>GSTM1A, GSTM1B</i>				
	hGSTM1b-1b	<i>GSTM1B</i>				
	hGSTM1a-2	<i>GSTM1A, GSTM2</i>				
	hGSTM1b-2	<i>GSTM1B, GSTM2</i>				
	hGSTM2-2	<i>GSTM2</i>				
	hGSTM4-4	<i>GSTM4</i>				
	hGSTM5-5	<i>GSTM5</i>				
	hGSTM3a-3a	<i>GSTM3A</i>				
π	hGSTP1a-1a	<i>GSTP1A</i>	11q13-q22	MGST3-3-3	<i>MGST3</i>	1p23
	hGSTP1a-1b	<i>GSTP1A, GSTP1B</i>				
	hGSTP1b-1b	<i>GSTP1B</i>				
	hGSTP1a-1c	<i>GSTP1A, GSTP1C</i>				
	hGSTP1b-1c	<i>GSTP1B, GSTP1C</i>				
θ	hGSTT1-1	<i>GSTT1</i>	Klaster w pozycji 22q11.23	Białko Aktywowane Przez S-lipogenezę	<i>FLAP</i>	13q11
	hGSTT2-2	<i>GSTT2, GSTT2P</i>				
σ	HGSTS1-1	<i>GSTS1</i>	4q21.22	Syntaza Leukotrienu C4	<i>SLTC4</i>	5q35
				GST mitochondrialne		
ζ	HGSTZ1-1	<i>GSTZ1</i>	14q24.23	Klasa	Enzymy	Geny
ω	HGSTO1-1	<i>GSTO1</i>	10q26.11			Lokalizacja w genomie
	k	hGSTK1-1	<i>GSTK1</i>			Nie znana

II. Funkcje i znaczenie wybranych GST

W tkankach ludzkich jak dotąd zidentyfikowano cztery GST klasy α . Przeciwdziałają one utlenianiu alkoholi, alkenów, epoksydów i chinonów [17]. Wykazują aktywność niezależnej od selenu peroksydazy wobec nadtlenków związków fosfatydylowych [18]. Wiążą 4-hydroksynonenal (HNE) uważany za bio-

marker uszkodzeń oksydacyjnych w tkankach [17]. Ekspresja genów GST klasy α (*GSTA*) ulega zmianom u chorych na różne nowotwory. Przypuszcza się, że *GSTA* uczestniczą w powstawaniu oporności na leki chemioterapeutyczne [18]. Mogą one również odgrywać znaczącą rolę w ochronie wewnątrzkomórkowych struktur przed oksydacyjnymi zniszczeniami, związanymi z wiekiem, arteriosklerozą, katakta, chorobami Parkinsona i Alzheimerera, jak również innymi chorobami degeneratywnymi [20].

Jak dotąd z tkanek ludzkich wyizolowano również trzy różne GST klasy π . Wykazują one taką samą specyficzność substratową, różnią się natomiast wydajnością katalizowanych przez nie reakcji. Są produktami form allelicznych tego samego genu *GSTP1*. GST klasy π są związane z transformacją no-

wotworową. Wykazano wzmożoną ich ekspresję przy różnych typach nowotworów, zmiany aktywności w stanach oporności na leki przeciwnowotworowe jak i zmianę ekspresji w onkogenezie [21-26]. W przypadkach raka piersi występuje nadprodukcja hGSTP1-1 w komórkach nie zawierających receptora estrogenu i brak ekspresji w komórkach zawierających ten receptor [26].

GST klasy μ dezaktywują szereg mutagennych i kancerogennych epoksydów. Odkryto do tej pory pięć podjednostek występujących w enzymach tej klasy oznaczonych od hGSTM1 do hGSTM5 [27, 28] o wysokiej identyczności sekwencji aminokwasowych. Geny GST tej klasy charakteryzują się znacznym podobieństwem sekwencji pomiędzy różnymi gatunkami [29].

GST klasy θ , wykazują małą aktywność z modelowym substratem CDNB [31] i nie wiążą się na kolumnach chromatografii powinowactwa [31-33]. Jest to przyczyną trudności w identyfikacji enzymów tej klasy. Do tej pory zidentyfikowano hGSTT1-1 [34] i hGSTT2-2 [35, 36]. Wykazują one pomiędzy sobą zaledwie 55% identyczności aminokwasowej. hGSTT1-1 katalizuje koniugację GSH z halometanami. Koniugacja monochlorometanu i tlenu etylenu prowadzi do detoksykacji tych związków, podczas gdy przy koniugacji z dichlorometanem powstaje mutageny metabolit S-chlorometylowy-GSH i toksyczny formaldehyd jako produkt końcowy [34]. Zależnie od enzymatycznej aktywności hGSTT1-1 wobec chlorometanu można sklasyfikować ludzi na tych, u których nie stwierdza się reakcji koniugacji, na tych, którzy wykazują małą aktywność oraz na wytwarzających dużą ilość koniugatów. Z kolei hGSTT2-2 jest najbardziej aktywna wobec nadtlenu kumenu i kwasu etakrynowego [8].

GST klasy θ wykazują większe podobieństwo do GST roślin i organizmów prokariotycznych niż do GST innych klas ssaków. Dlatego sugeruje się, że wraz z GST klasy ζ reprezentują one najstarsze ewolucyjne formy, z których powstały inne klasy przez duplikację genową i późniejsze zróżnicowanie [2, 9, 31, 37].

III. Znaczenie polimorfizmów genów *GSTA*

Rodzina genów GST klasy α składa się z co najmniej czterech genów i kilku pseudogenów z delecjami pojedynczej zasady i/lub całego eksonu. Geny są zlokalizowane w klasterze na chromosomie 6 w pobliżu centromeru, w pozycji 6p12 [20, 38]. Geny GST klasy α najprawdopodobniej ewoluowały przez duplikację i konwersję [39]. Wszystkie geny GST klasy α są zbudowane z 7 eksonów (Ryc. 1a). B o a r d i W e b b [40] po raz pierwszy scharakteryzowali klon cDNA podjednostki hGSTA1 i przez hybrydyzację *in situ* zlokalizowali jej gen oraz zasugerowali istnienie innych *GSTA* w tym samym regionie. Gen *GSTA1* jest złożony z około 12 kpz i otoczony genami innych podjednostek klasy α [39]. Gen kodujący podjednostkę hGSTA2 składa się z około 13

kpz [41]. *GSTA1* i *GSTA2* powstały prawdopodobnie w wyniku niedawnej duplikacji i regulacja ich transkrypcji jest podobna [42]. Dalsze badania pozwoliły na zidentyfikowanie genu *GSTA3* [38], który jednak nie ulegał ekspresji *in vivo* [43], jak i genu *GSTA4* [20]. Gen *GSTA4* zajmuje odcinek około 18 kpz. W regionie promotorowym w pobliżu eksonu 1 tego genu jest zlokalizowany gen 7S snRNA w orientacji głowa-ogon [20].

C o l e s i wsp. chcąc wyjaśnić różnice osobnicze w ekspresji genów *GSTA* w ludzkiej wątrobie [44] zbadali promotory *GSTA1* i *GSTA2*. Odkryli oni polimorfizmy w części promotorowej *GSTA1* (Ryc. 1a). Odróżnili dwa genotypy: *GSTA1A* (-631T albo G, -567T, -69C, -52G) oraz *GSTA1B* (-631 G, -567G, -69T, -52A). Analiza częstości występowania substytucji -69C→T pokazała, że polimorfizm jest szeroko rozpowszechniony u białych Amerykanów, Afroamerykanów i Amerykanów pochodzenia hiszpańskiego. Dalsze badania wykazały różnice w poziomie ekspresji genów: homozygoty *GSTA1A* \approx *GSTA2* > heterozygoty *GSTA1A/B* > homozygoty *GSTA1B*. Potrzebne będą dalsze badania by zanalizować, czy ten polimorfizm i towarzysząca mu zmiana w ekspresji genowej ma wpływ na osobnicze możliwości detoksykacji metabolitów kancerogenów i leków stosowanych w chemioterapii. Polimorfizmy w genach *GSTA* nie są jeszcze dobrze zbadane. Kilka zauważonych polimorfizmów wewnątrz genów *GSTA1* i *GSTA2* prowadzi bądź do cichych mutacji, bądź do takich, które nie zmieniają właściwości fizykochemicznych enzymów przez nie kodowanych [45]. Brak jak na razie doniesień o polimorfizmach w innych genach tej klasy.

IV. Znaczenie polimorfizmów genu *GSTP1*

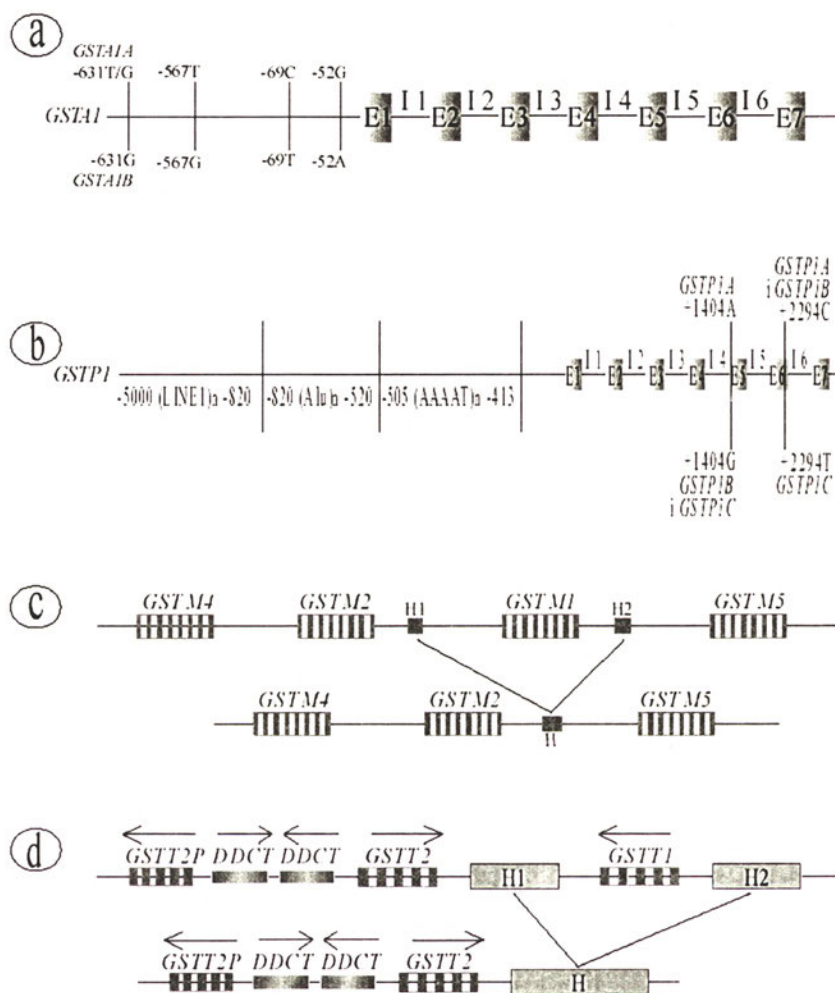
Pierwsza praca dotycząca lokalizacji *GSTP1* w genomie pochodzi z 1983 roku [46] i donosi o lokalizacji tego genu na chromosomie 11 w pozycji od 11q13 do 11q22. Gen *GSTP1* zmapowano w pobliżu genów związanych ze schorzeniami nowotworowymi, onkogenów i protoonkogenów takich jak *bcl1/prad1*, *int2*, *hotf1* i *sea*. W nowotworach piersi, oraz w raku łuskiowatym (SCC) występuje korelacja zwiększonej ekspresji niektórych z tych onkogenów ze zwiększoną ekspresją *GSTP1* [47, 137, 138]. Sądzi się, że GST klasy π są kodowane przez pojedynczy gen, chociaż X u i S t a m b r o o k [24] donoszą o istnieniu dwóch niezależnych genów *mgstp* u myszy. A l i - O s m a n i i wsp. [47] wykazują, że w *locus* genu *GSTP1* istnieje polimorfizm, co może tłumaczyć istnienie różnych białek GST klasy π u

człowieka. Istnieje także nieaktywny transkrypcyjnie pseudogen *GSTP1P* znajdujący się na chromosomie 12 [3]. Rycina 1b przedstawia schemat genu *GSTP1* z uwzględnieniem polimorfizmów. Gen *GSTP1* zawiera około 2,8 kpz i składa się z 7 eksonów i sześciu intronów [48].

W regionie promotorowym *GSTP1* znaleziono interesującą sekwencję między pozycjami -505 i -413 [49]. Jest to region bogaty w pary AT i zawierający

eksonie 6, która w konsekwencji prowadzi do zmiany w podjednostce w pozycji 114 Ala na Val. *GSTP1B* charakteryzuje się tylko tranzycją A do G w pozycji +1404 w eksonie 5 (Ile 105 Val) (Ryc. 1b).

W formach allelicznych genu *GSTP1* zaobserwowano także pewne strukturalne różnice w intronach, takie jak transwersje, delecje i insercje, prowadzące do powstania nowych miejsc restrykcyjnych. Lo i Ali-Osman [51, 52] zauważyli, że insercja G w



Ryc. 1. Schematy genów GST z zaznaczeniem najważniejszych polimorfizmów. [wg 20, 36, 38, 40, 41, 44, 46-49, 63, 88, 135]. a: Schemat genu *GSTA1*. W części promotorowej *GSTA1* występują polimorfizmy dające allele *GSTA1A* i *GSTA1B*. E1-E7 – eksony 1-7, I1-I6 – introny 1-6. b: Schemat genu *GSTP1* z polimorfizmami dającymi allele *GSTP1A*, *GSTP1B* i *GSTP1C*. W części promotorowej w pozycjach -5000 do -820 występują elementy powtarzające się LINE, w pozycjach -820 do -520 elementy powtarzające się Alu oraz w pozycjach od -515 do -413 powtarzająca się sekwencja AAAAT. E1-E7 – eksony 1-7, I1-I6 – introny 1-6 c i d: Schematy klasterów genowych odpowiednio *GSTM* i *GSTT*. Wykazano *crossing-over* pomiędzy homologicznymi sekwencjami H1 i H2, powodujący wypadnięcie z genomu całego genu odpowiednio *GSTM1* i *GSTT1* i generującego sekwencję H. Miejsca zaciemnione w blokach genowych *GSTM* i *GSTT* odpowiadają eksonom.

17 tandemowo palindromicznie ułożonych powtórzeń motywu AAAAT (Ryc. 1b). Powtórzenia te okazały się być polimorficzne [50].

Ali-Osman i wsp. [47] sklonowali cDNA dla trzech form allelicznych *GSTP1A*, *B* i *C*. Wyizolowali także pełne geny *GSTP1A* i *GSTP1C*. W *GSTP1C* scharakteryzowali tranzycję A do G w pozycji +1404 w eksonie 5, co powoduje zmianę w podjednostce w pozycji 105 z Ile na Val i tranzycję C do T w +2294 w

intronie 1 genu *GSTP1C* w pozycji +51, w środku elementu odpowiedzi na insulinę (IRE-A) o sekwencji CCCGCCTC (+45 do +52 pz), stworzyła dodatkową możliwość metylacji 5'-cytozyny. W klonowanym *GSTP1C*, w regionie od +1521 do +1644 (intron 5) znaleziono jedną sekwencję palindromową i dwa funkcjonalne elementy RA-RE: A(G)GG(T)TC-(G)A. W komórkach potraktowanych kwasem retynolowym występuje wyraźne wiązanie białkowych

kompleksów jądrowych w miejscach RA-RE. Ekspresja genu *GSTP1* zwiększa się w komórkach transfekowanych genem *GSTP1* i traktowanych *trans*-RA. Z drugiej strony X i a i wsp. [53, 54] wykazali, że RA znosi aktywność promotora *GSTP1*. Wyniki powyższych badań wskazują na złożony mechanizm regulacji genu *GSTP1* przez RA w komórkach nowotworowych. Budowa promotorów form allelicznych *GSTP1* jest identyczna.

Osoby posiadające genotyp z daną formą alleliczną mogą charakteryzować się różną podatnością na choroby nowotworowe oraz różną odpowiedzią na chemioterapię. Zmniejszoną częstotliwość występowania genotypu *GSTP1A* zaobserwowano u pacjentów z rakiem tchawicy i przełyku [55] oraz płuc [56]. U pacjentów z rakiem płuc zaobserwowano także mniej adduktów karcinogen-DNA w grupie palaczy z genotypem *GSTP1A* [56]. Wśród osób z objawami astmy oskrzelowej stwierdzono zmniejszoną częstotliwość występowania *GSTP1C* [57].

V. Znaczenie polimorfizmów *GSTM*

Początkowe badania genów GST klasy μ wykazywały różne lokalizacje [58-60]. Ross i wsp. [61] sklonowali i scharakteryzowali *GSTM4*. Za pomocą hybrydyzacji *in situ* zlokalizowali gen na chromosomie 1 w pozycji 1p13. Wyszuli również przypuszczenie, że geny GST klasy μ występują w klastercie. Okazało się, że geny *GSTM1* i *GSTM2* leżą bardzo blisko siebie na chromosomie 1 w pobliżu pozycji 1p13.3 i wykazują 99% identyczności sekwencyjnej [62]. Ostatecznie Xu i wsp. [63] wykazali, że 4 geny GST klasy μ występują w obszarze 20 kbp w kolejności: 5'-*GSTM4-GSTM2-GSTM1-GSTM5*-3' (Ryc. 1c). Jest możliwe, że *GSTM3*, w odróżnieniu od wszystkich innych dotychczas odkrytych GST klasy μ , występuje na chromosomie 3 [27, 64].

Taylor i wsp. [65] wykazali, że istnieje wysoki poziom identyczności sekwencji nukleotydowej pomiędzy genami GST klasy μ u człowieka i u szczura, nie tylko w eksonach, ale także i w niektórych intronach. Te zachowawcze sekwencje są zgodne z homologicznymi sekwencjami konwersji genowych występujących w regionie od intronu 4 do eksonu 5 u obu gatunków, które mogły doprowadzić do powstania subklas. Delecje w intronie 3 występują w tym samym miejscu w genach szczura i człowieka. W regionach o zachowawczych sekwencjach występują przypuszczalnie elementy regulatorowe transkrypcji.

GSTM2 i *GSTM3* wykazują różne profile hybrydyzacyjne w regionie intron 4-ekson 5 oraz brak identyczności w intronie 5, co sugeruje, że nie są one

produktem niedawnej duplikacji. Wysoki poziom identyczności sekwencyjnej w intronie 2 i intronie 3 może oznaczać, że genowa konwersja była jednak następstwem dawniejszej duplikacji. W rodzinie genowej GST klasy μ konwersje są nietypowe, ponieważ występują także w sekwencjach intronów. Najprawdopodobniej odpowiedzialne są za to występujące w intronach elementy regulatorowe [65].

Przypuszczalnie występuje związek w ekspresji genowej pomiędzy *GSTM3* i *GSTM1A* [30]. Nakajima i wsp. [66] stwierdzili, że osoby z brakiem *GSTM1* wykazują mniejszą ekspresję *GSTM3* i prawdopodobnie także *GSTM2*.

Zhong i wsp. [27] wykazali, że organizacja *GSTM1* i *GSTM4* jest podobna do genu *rgstm2* u szczura. W obydwu występuje 7 intronów i 8 eksonów. Region kodujący gen *GSTM4* wraz z intronami zawiera 5 kbp, natomiast region kodujący *GSTM1* 5,5 kbp. Jest to związane z długością intronu 7. *GSTM4* jest bliżej spokrewniony z *GSTM1* i *GSTM2* niż z *GSTM3*.

U około 45% Europejczyków stwierdzono ekspresję genu *GSTM1* o dwóch wariantach allelicznych: *GSTM1A* i *GSTM1B*, kodujące hGSTM1a i hGSTM1b, które różnią się jedynie jednym aminokwasem. hGSTM1a zawiera w pozycji 172 lizynę, a hGSTM1b asparaginę. Podjednostki te tworzą dwa homodimery, hGSTM1a-1a i hGSTM1b-1b oraz heterodimer hGSTM1a-1b. Wszystkie trzy warianty alleliczne wykazują identyczne działanie [27].

U około połowy (procent zależny od rasy i regionu świata) ludzkiej populacji występuje brak w genotypie *GSTM1* [66, 100]. Wydaje się, że jest to rezultat homologicznego nierównego *crossing-over* dwóch regionów powtórzeń, o wysokiej identyczności sekwencyjnej, flankujących ten gen z obu stron na przestrzeni 4,2 kbp. Lewy region tych powtórzeń znajduje się 5 kbp poniżej 3'-końca genu *GSTM2* i 5 kbp powyżej 5'-końca genu *GSTM1*. Prawy region powtórzeń jest 5 kbp poniżej końca 3' *GSTM1* i 10 kbp powyżej końca 5' genu *GSTM5* (63). W wyniku tego *crossing-over* powstaje delecja 15 kbp zawierająca cały gen (Ryc. 1c). Większość delecji *GSTM1* jest wywołana rekombinacją w tych samych dwóch regionach. Sekwencje flankujące lewy i prawy region powtórzeń wykazują 92% identyczności. Mc Lellan i wsp. [67] odkryli sytuację odwrotną do delecji u dwóch osób ze zwiększoną aktywnością enzymu hGSTM1-1. Była to duplikacja *GSTM1*.

Brak *GSTM1* jest przyczyną zwiększonej wrażliwości na chemiczne kancerogeny i w związku z tym może być czynnikiem ryzyka występowania chorób nowotworowych [68, 69]. Liczne prace wskazują na

powiązania pomiędzy brakiem *GSTM1* i wrażliwością na zapadanie na choroby nowotworowe, szczególnie w takich tkankach jak płuca, piersi, pęcherz moczowy i jelito grube [27, 70-76]. Brak *GSTM1* jest także powiązany z powstawaniem arteriosklerozy [77], chorobami Parkinsona i Alzheimerza [78], zaburzeniami miesiączkowania [79]. Po naświetlaniu prób krwi dawką 1 Gy promieniowania X okazało się, że aberracje chromosomowe były liczniejsze u osób z brakiem *GSTM1*, szczególnie u palaczy. Taki wynik wskazuje na to, że genotyp *GSTM1* wywiera wpływ na możliwość naprawy DNA [80]. W przypadku choroby Crohna wykazano, że genotyp *GSTM1B* występował rzadziej niż u zdrowych osobników. Przyczyna tego stanu rzeczy nie jest jasna zważywszy na to, że wobec produktów form allelicznych *GSTM1* nie stwierdzono różnic fizykochemicznych [81]. Zwiększoną częstotliwość występowania genotypu delecyjnego wykazano także u pacjentów z astmą oskrzelową. Osoby, u których stwierdzono brak genu, miały ok. 3,5 razy podwyższone ryzyko rozwijania się astmy [82]. Z kolei Wilson i wsp. [83] donoszą o zmniejszonym ryzyku wystąpienia zawału mięśnia sercowego u osób z brakiem *GSTM1*, szczególnie wśród palaczy.

Również *GSTM3* występuje w dwóch formach allelicznych: *GSTM3A* i *GSTM3B*. *GSTM3A* cechuje się mniejszą ekspresją w porównaniu z *GSTM3B* w tych samych warunkach [30]. Różnica między tymi dwoma formami polega na trójnukleotydowej delecji (TTT) w intronie 6 *GSTM3A* generującej motyw 5'-AAGATA-3' rozpoznawany przez czynnik YY1 hamujący transkrypcję [30]. Analiza genotypowa populacji w Wielkiej Brytanii wykazała, że homozygoty *GSTM3A* stanowią 70,9%, heterozygoty *GSTM3A/B* 25,8% natomiast homozygoty *GSTM3B* zaledwie 3,4% populacji [84]. W pracy Mathiasa i wsp. [85] częstotliwość występowania homozygoty *GSTM3B* była istotnie zmniejszona w przypadku raka SCC języka. Podobnie częstotliwości występowania heterozygoty *GSTM1A/B* i homozygoty *GSTM3B* była mniejsza w przypadkach raka SCC krtani, podczas gdy nie zanotowano istotnych różnic w raku tchawicy [86].

VI. Znaczenie polimorfizmów genów *GSTT*

Webb i wsp. [87] zmapowali gen *GSTT1*, a Tan i wsp. [36] gen *GSTT2* na chromosomie 22 w pozycji 22q11.23. *GSTT1* i *GSTT2* są oddalone od siebie o około 50 kpz. Mają podobną strukturę i składają się z 5 eksonów. Długość *GSTT1* wynosi 8,1 kpz, podczas gdy *GSTT2* tylko 3,7 kpz. Gen *GSTT2* leży „głową”

do „głowy” z genem kodującym tautomerazę D-dopachromu (*DDCT*) o długości 8,5 Kpz. Sekwencja między *GSTT2* i *DDCT* może zawierać dwukierunkowy promotor. Geny *GSTT2* i *DDCT* są duplikowane w odwróconym powtórzeniu. Ryc. 1d przedstawia schemat klasteru genowego *GSTT* wraz z *DDCT* jak i schemat polimorfizmu *GSTT1*.

Zduplikowany gen *GSTT2* jest pseudogenem (*GSTT2P*) posiadającym tranzycję GA w miejscu składania pomiędzy eksonem 2 i intronem 2, trzy tranzycje GA w eksonie 4 zmieniające Val-118 na Met, Glu-129 na Lys i Met-139 na Ile oraz tranzycję CT w eksonie 5 zmieniającą Arg-196 na przedwczesny sygnał stop translacji. Przedwczesny sygnał stop nie występuje u wszystkich badanych osób. Również cały pseudogen okazał się być polimorficzny i 28% ze 106 zbadanych osób nie posiadało go, a u jednej z osób występował tylko pseudogen. [8].

U części populacji stwierdza się brak *GSTT1*. Delecja dotyczy całego *GSTT1*, ale nie *GSTT2* [36], co wskazuje na to, że jeden z punktów przecięcia występuje pomiędzy *GSTT1* i *GSTT2*, podczas gdy drugi mieści się poniżej końca 3' *GSTT1*. Gen *GSTT1* jest otoczony przez regiony 18 kpz, które wykazują homologię w ponad 90% [88]. Delecja *GSTT1* generuje sekwencję, która różni się od homologicznych sekwencji flankujących gen tylko w kilku punktach. Te dane sugerują, że za delecję odpowiedzialny jest w tym przypadku nierówny homologiczny *crossing over* (Rys. 1d).

Częstotliwość występowania polimorfizmu była badana w różnych grupach etnicznych na całym świecie. Okazało się, że różnice w genotypie występują zarówno pomiędzy rasami jak i wewnątrz grup etnicznych. Genotyp z brakiem genu występuje u 9-65% różnych populacji [88-99]. Wśród Polaków częstotliwość występowania delecji wynosiła 16,3% [99].

Chen i wsp. [100] porównali częstotliwość delecji genu *GSTT1* u pacjentów z syndromem mielodysplazji i u zdrowych w podobnym wieku i tej samej rasy i płci. Częstość tego genotypu wynosiła 46% u badanych chorych i 16% u zdrowych. Brak *GSTT1* może być powodem zwiększonej wrażliwości na ksenobiotyki [2, 101, 102]. Liczne prace wskazują na powiązanie braku *GSTT1* z chorobami nowotworowymi [57, 86, 103-107]. Częstość delecji *GSTT1* była również większa we wrzodowym zapaleniu okrężnicy, co wskazuje na udział tego genu w niektórych chorobach o charakterze zapalnym [81]. Naoe i wsp. [108] zbadali istotność braku *GSTT1* w prognozie leczenia chemioterapią pacjentów z ostrą białaczką szpiku kostnego. Grupa pacjentów, u któ-

rych stwierdzono brak genu wykazała gorsze rokowania. Współczynnik wczesnego zgonu po rozpoczęciu chemioterapii był większy w grupie z brakiem genu. Potwierdza to zmniejszoną zdolność do detoksykacji u osób z brakiem *GSTT1* [108]. Podobnie jak w przypadku *GSTM1*, brak genu *GSTT1* wiąże się ze zwiększonym ryzykiem zapadania na astmę oskrzelową [82]. Z kolei w pracy dotyczącej występowania polimorfizmów enzymów metabolizujących związki chemiczne [109], u zdrowych dziewięćdziesięcio- i stułatków wykazano zmniejszoną częstotliwość występowania *GSTT1*, w porównaniu z młodszymi ($46,0 \pm 11,3$ lat) zdrowymi osobami biorącymi udział w eksperymencie. Jest to fakt wymagający dalszej analizy by móc ocenić jego wagę, wskazujący na to, że nie możemy wyciągać istotnych wniosków z obserwacji pojedynczych genotypów.

Opisano także jeden bardzo rzadki przykład polimorfizmu w genie *GSTT2* u Australijczyków i Europejczyków, którego wynikiem jest substytucja Met 139 na Ile, co jednak nie wydaje się pociągać za sobą ważnych konsekwencji fenotypowych [8].

VII. Uwagi końcowe

W poprzednich rozdziałach przedstawione zostały podstawowe rodzaje polimorfizmu genów kodujących hGST i przypuszczalne znaczenie każdego z nich dla funkcjonowania organizmu. Jednakże detoksykacja *in vivo*, jak i powstawanie chorób oraz ich zwalczanie przez organizm są procesami nazbyt skomplikowanymi, żeby można było je wyjaśnić śledząc funkcjonowanie pojedynczego genu czy poszczególnych genów rodziny genowej. Poza tym nawet wzajemne powiązania produktów genów danej rodziny mogą się okazać niewystarczające do określenia przyczyn danego zjawiska występującego w organizmie. Ponieważ pomiędzy osobnikami tego samego gatunku daje się zauważyć dużą różnorodność pod względem wrażliwości na choroby, jak również pod względem reakcji na leki stosowane w toku terapii, przyczyn należy szukać w genotypie tych osobników. Badacze zaczęli poszukiwać wzajemnych powiązań pomiędzy genami GST i innymi genami pierwszej i drugiej fazy detoksykacji w organizmie. W tabeli 2 zostały przedstawione udokumentowane w piśmiennictwie zależności pomiędzy wrażliwością na choroby wywoływane czynnikami środowiskowymi, a genotypem GST.

Dobrym przykładem ewolucji naszej wiedzy dotyczącej etiologii choroby i czynników ryzyka jej wystąpienia mogą stanowić badania nad nowotworami płuc. Jako na najważniejszy środowiskowy czyn-

nik ryzyka rozwinęcia się nowotworów płuc wskazuje się na produkty dymu tytoniowego. Różnice we wrażliwości na ten czynnik mogą wpływać z różnic fenotypowych odnoszących się do ekspresji enzymów przeprowadzających detoksykację tych produktów. Jako jeden z takich enzymów był badany hGSTM1-1. Już w 1986 r. Seidegård i wsp. [70] wykazali, że palacze z brakiem genu kodującego podjednostkę tego homodimeru znajdują się w grupie zwiększonego ryzyka na rozwiniecie raka płuc. Inne prace potwierdzają ten wynik pośrednio, bądź bezpośrednio [69, 110-113]. Były też jednak badania, które wskazywały na bardzo słabe powiązanie genotypu *GSTM1* z rakiem płuc [74, 114].

Grinberg-Funes i wsp. [115] u osób z brakiem *GSTM1* zauważyli odwrotną korelację pomiędzy adduktami związków aromatycznych (obecnych w dymie papierosowym) z DNA a poziomem witamin E i C w surowicy. Ryberg i wsp. [116] porównali poziomy powyższych adduktów w zależności od genotypu *GSTM1*, stopnia nasilenia palenia i płci. Wykazali oni zwiększoną ilość adduktów w grupach z brakiem *GSTM1*. Osiągały one najwyższe wartości u kobiet, korelujące z ilością papierosów wypalanych dziennie. Wskazali w ten sposób, że różnica płci może stanowić jeszcze jeden czynnik wrażliwości na zapadanie na choroby nowotworowe związane z dymem tytoniowym.

W późniejszej pracy Ryberg i wsp. [56] stwierdzili, że poziom hydrofobowych adduktów DNA w płucach mężczyzn-palaczy był zależny bardziej od polimorfizmu *GSTP1* niż od polimorfizmu *GSTM1*. Ponadto, kiedy zanalizowali jednocześnie występowanie genów *GSTM1* i *GSTP1* okazało się, że największe ilości adduktów wykazywali pacjenci z brakiem *GSTM1* oraz posiadający przynajmniej w jednym allelu gen *GSTP1B* albo *GSTP1C*. Istotną korelację pomiędzy brakiem *GSTM1* i zwiększonym ryzykiem zapadalności na raka płuc wykazano u pacjentów diagnozowanych przed ukończeniem 66 lat [117]. Ostatnie prace dotyczące nowotworów płuc zajmują się już poszczególnymi rodzajami raka SCC lub AC, jak i większą ilością zmodyfikowanych równocześnie genotypów. Allan i wsp. [118] stwierdzili, że genotypy z jednoczesnymi polimorfizmami genów *GSTM1*, *GSTM3* i *GSTP1* występowały z większą częstotliwością u pacjentów z SCC niż z rozpoznaniem AC. Przyczyną tego może być obniżona w takich warunkach detoksykacja związków aromatycznych, które są w większym stopniu odpowiedzialne za powstawanie SCC niż AC. Wykazali oni także u osób z brakiem *GSTT1*, u których występował jednocześnie *GSTP1C* lub *B*

zwiększone ryzyko zapadania na nowotwory płuc [118].

Geny *GSTM1A* i *GSTM1B* odgrywają rolę w zmniejszeniu ryzyka występowania raka pęcherza moczowego, krtani, szyi, skóry i jelita grubego [76, 86, 104, 119, 120]. W przypadku raka pęcherza mo-

ryzyko zapadania na raka śledziony. Odwrotna sytuacja wynika z badań A u t r u p a i wsp. [123], którzy stwierdzili, że genotyp *GSTM1* wpływa na ostrą białaczkę szpiku kostnego, a nie *GSTT1* ani *GSTP1*. W tej pracy pojawia się jeszcze jeden interesujący aspekt. Mianowicie, podczas gdy pacjenci z co naj-

Tabela 2

Zależność pomiędzy wrażliwością na choroby wywoływane czynnikami środowiskowymi, a genotypem GST

Brak genu <i>GSTM1</i>	Podwyższone ryzyko: raka głowy, szyi, płuc, pęcherza moczowego, AC żołądka i dystalnej części jelita grubego jelita grubego, SCC [27, 69-76, 86, 104, 105, 110-113, 115, 118-120, 122, 127-129, 131, 133]; ostrej białaczki szpiku kostnego [123]; wystąpienia nowotworu podczas długotrwałej wysokiej ekspozycji na dym papierosowy [124]; arteriosklerozy [77]; choroby Parkinsona i Alzheimera [77]; astmy oskrzelowej [82]; reumatoidalnego zapalenia stawów [124].
	Zwiększona indukcja adduktów PAH-DNA w płucach u Japończyków [114].
	Występują częściej: zaburzenia miesiączkowania [79]; aberracje chromosomowe po naświetlaniu promieniami X [80].
	Zmniejszone ryzyko zawału mięśnia sercowego [83].
Genotypy <i>GSTM1A/B</i> lub <i>GSTM3B/B</i>	Ochrona: przeciw SCC krtani [87]; raka podstawowych komórek skóry [85, 136].
Homozygoty <i>GSTM3A/A</i>	Podwyższone ryzyko SCC języka [85] i krtani [86].
Brak genu <i>GSTT1</i>	Podwyższone ryzyko: wrzodowego zapalenia okrężnicy [81]; mielodysplazji [100]; astmy oskrzelowej [82]; SCC krtani [86]; raka podstawowych komórek skóry (zwiększony przyrost guzów ^a [134] i zmniejszony czas powstawania przerzutów [135]); raka śledziony
	Gorsze rokowania w leczeniu chemioterapią u pacjentów z ostrą białaczką szpiku kostnego [108].
Homozygoty bądź heterozygoty <i>GSTP1B</i> i <i>GSTP1C</i>	Podwyższone ryzyko: raka tchawicy, przełyku, pęcherza moczowego [55, 131], SCC płuc oraz większa ilość adduktów karcinogen-DNA szczególnie wśród palaczy [56].
Homozygoty <i>GSTP1C</i>	Mniejsze ryzyko astmy oskrzelowej [57].
Jednoczesny brak genu <i>GSTM1</i> z genotypem <i>GSTP1B</i> lub <i>GSTP1C</i>	Zwiększona indukcja adduktów PAH-DNA w płucach ludzi rasy białej [56].

Wyjaśnienie skrótów: AC — rak gruczolakowaty; PAH — związki poliaromatyczno-hydrofobowe; SCC — rak łuskowaty

^aJako przyrost guzów definiuje się liczbę guzów/rok pojawiających się od czasu powstania pierwszego guza.

czowego zwiększone ryzyko wykazano w obecności genu *GSTT1*, a nie przy jego braku [121]. W takiej sytuacji brak *GSTM1* z jednoczesną obecnością *GSTT1* być może potęguje ryzyko zachorowania. Brak genu *GSTT1* zwiększa ryzyko wystąpienia SCC krtani. Jednocześnie stwierdzono, że homozygoty *GSTM3B* wykazują mniejsze ryzyko zapadalności na tę chorobę [86]. Po raz kolejny potwierdzono w ten sposób, że śledzenie pojedynczych genotypów w żadnym wypadku nie może być wystarczające w badaniu tak skomplikowanych procesów.

W pracy D u e l l i i wsp. dotyczącej raka śledziony stwierdzono, że palenie i polimorfizm delecyjny *GSTT1* zwiększają ryzyko zapadania na chorobę występującą częściej u kobiet niż u mężczyzn [122]. Natomiast genotyp *GSTM1* nie wywierał wpływu na

mniej jednym allelem *GSTM1* wykazywali dłuższy czas przeżycia, to pacjenci z jego brakiem, traktowani kumulowaną małą dawką adriamicyny, wykazywali również większą przeżywalność [123]. Widać w ten sposób, że dobroczynny genotyp w określonych warunkach może się okazać fatalny w skutkach.

Nie tylko choroby nowotworowe stanowią przedmiot badania w pracach dotyczących GST, chociaż dominują ilościowo. M a t t e y i wsp. [124] zbadali wpływ palenia i genotypu *GSTM1* na reumatoidalne zapalenie stawów. Korzystnie wpływa występowanie genotypu *GSTM1*. Pacjenci z brakiem *GSTM1*, którzy palili kiedykolwiek mieli istotnie gorsze rokowania niż pacjenci z brakiem *GSTM1*, którzy nigdy nie palili. Produkcja czynnika reumatoidalnego była powiązana z paleniem tylko u pacjentów z dele-

cyjnym genotypem [124]. W innej pracy dotyczącej astmy oskrzelowej I v a s c h e n k o i wsp. [82] wykazali, że osoby z brakiem *GSTM1* wykazywały 3,5 razy większe ryzyko rozwinienia się astmy. Również osoby z brakiem *GSTT1* znajdowały się w grupie o podwyższonym ryzyku zachorowania. Genotyp decyzyjny obu genów występował 4 razy częściej u chorych niż w grupie kontrolnej [82].

Powyższe rozważania pokazują jak dużą rolę na rozwój jak i na rokowania terapeutyczne choroby mogą odgrywać polimorfizmy takich genów jak *GST*. Enzymom *GST* przypisuje się rolę w nabywaniu przez komórki oporności na leki dzięki przeprowadzaniu przez nie detoksykacji tych leków i ułatwianiu usuwania ich na zewnątrz komórki poprzez pompę zależną od związków sprzęganych z glutationem. Enzymy *GST* przeprowadzając detoksykację szkodliwych toksyn (często czynników kanцерогенных) chronią organizm przed rozwojem wywołanych przez te toksyny chorób. Polimorfizmy genów kodujących te enzymy prowadzą do osłabienia ich ekspresji, albo niekiedy i do całkowitego jej braku. W oczywisty sposób prowadzi to do osłabienia mechanizmów obronnych organizmu. Z drugiej strony w nielicznych przypadkach reakcja sprzęgania GSH z egzogennym substratem może doprowadzić do powstania szkodliwego metabolitu. Ekspresja genów *GST* może także wywierać niekorzystny wpływ na leczenie niektórych nowotworów w związku z tym, że kodowane przez nich enzymy usuwają leki z komórek nowotworowych, przyczyniając się w ten sposób do nabycia oporności na leki. Badania nad etiologią chorób, jak i nad procesami detoksykacji w organizmie są bardzo skomplikowane i nasza wiedza jest daleka od doskonałości. Nowoczesna technologia daje możliwości szybszych i dokładniejszych badań zarówno na poziomie klinicznym jak i molekularnym. Intensywne badanie, połączone wysiłki różnych specjalności powinny doprowadzić do coraz to bardziej zadowalających wyników. Nie da się jednak zaprzeczyć, że będzie to proces długotrwały i zapewne nie wolny od błędów i sprostowań.

Artykuł otrzymano 21 października 2002

Zaakceptowano do druku 8 maja 2003

Piśmiennictwo

- Walter Z (1994) W: *Białka komórek prawidłowych i patologicznych* Ł.T.N.: 151-171
- Landi S (2000) *Mutat Res Rev* **463**: 247-283
- Mannervik B, Awasthi YC, Board PG, Hayes JD, Di Ilio C, Ketterer B, Listowsky I, Morgenstern R, Muramatsu M, Pearson WR, Pickett CB, Sato K, Widersten M, Wolf CR (1992) *Biochem J* **282**: 305-308
- Sheehan D, Meade G, Foley VM, Dowd CA (2001) *Biochem J* **360**: 1-16
- Mannervik B, Alin P, Guthenberg C, Jensson H, Tahir MK, Warholm M, Jornvall H (1985) *Proc Natl Acad Sci USA* **82**: 7202-7206
- Meyer DJ, Coles B, Pemble SE, Gilmore KS, Fraser GM, Ketterer B (1991) *Biochem J* **274**: 409-414
- Meyer DJ, Thomas M (1995) *Biochem J* **311**: 739-742
- Coggan M, Whitbread L, Whittington A, Board P (1998) *Biochem J* **334**: 617-623
- Board PG, Baker RT, Chelvanayagam G, Jermini LS (1997) *Biochem J* **328**: 929-935
- Board PG, Coggan M, Chelvanayagam G, Eastal S, Jermini LS, Schulte GK, Danley DE, Hoth DE, Griffor MC, Kamath AV, Rosner MH, Chrunyk BA, Perregaux DE, Gabel ChA, Geoghegan KF, Pandit J (2000) *J Biol Chem* **275**: 24798-24806
- Stevens JM, Armstrong RN, Dirr HW (2000) *Biochem J* **251**: 341-346
- Kraus P (1980) *Hoppe-Seyler's Physiol Chem* **361**: 9-15
- Harris JM, Meyer DJ, Coles B, Ketterer B (1991) *Biochem J* **278**: 137-141
- Addya S, Mullick J, Fang J-K, Avadhani NG (1994) *Arch Biochem Biophys* **310**: 82-88
- Pemble SE, Wardle AF, Taylor JB (1996) *Biochem J* **319**: 749-754
- Welsch DJ, Creely DP, Hauser SD, Mathis KJ, Krivi GG, Isakson PC (1994) *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 9745-9749
- Hubatsch I, Riderstrom M, Mannervik B (1998) *Biochem J* **330**: 175-179
- Morel F, Schulz WA, Sies H (1994) *Biol Chem Hoppe Seyler* **375**: 641-649
- Singhal SS, Zimniak P, Sharma R, Srivastava SK, Awasthi S, Awasthi YC (1994) *Biochim Biophys Acta* **1204**: 279-286
- Desmots F, Rauch C, Henry C, Guilluzo A, Morel F (1998) *Biochem J* **336**: 437-442
- Saburi Y, Nakagawa M, Ono M, Sakai M, Muramatsu M, Kohno K, Kuwano M (1989) *Cancer Res* **49**: 7020-7025
- Cole SP, Downes HF, Mirski SE, Clements DJ (1990) *Mol Pharmacol* **37**: 192-197
- Puchalski RB, Fahl WE (1990) *Proc Natl Acad Sci USA* **87**: 2443-2447
- Xu X, Stambrook PJ (1994) *J Biol Chem* **269**: 30268-30273
- Hofs HP, Wagener TD, de Valk-Bakker V, van Rennes H, Doesburg WH, Ottenheijm HC, de Grip WJ (1997) *Anti-Cancer Drugs* **8**: 349-357
- Jhaveri M, Morrow CS (1998) *Biochim Biophys Acta* **1396**: 179-190
- Zhong S, Spurr NK, Hayes JD, Wolf CR (1993) *Biochem J* **291**: 41-50
- Hayes JD, Pulford JD (1995) *Crit Rev Biochem Mol Biol* **30**: 445-600
- Tam MF, Hsieh CH, Tsai SP, Tam TC (1998) *Biochem J* **333**: 735-739
- Inskip A, Elexperu-Camiruaga J, Buxton N, Dias PS, Mac Intosh J, Campbell D, Jones PW, Yengi L, Talbot JA, Strange RC, Fryer AA (1995) *Biochem J* **312**: 713-716
- Jemth P, Stenberg G, Ghaga G, Mannervik B (1996) *Biochem J* **316**: 131-136
- Aceto A, Dragani B, Bucciarelli T, Sacchetta P, Martini F, Angelucci S, Amicarelli F, Miranda M, Di Ilio C (1993) *Biochem J* **289**: 417-422
- Singhal SS, Saxena M, Awasthi S, Mukhtar H, Zaidi SI, Ahmad H, Awasthi YC (1993) *Biochim. Biophys. Acta* **1163**: 266-272

34. Pemble S, Schroeder KR, Spencer SR, Meyer DJ, Hallier E, Bolt HM, Ketterer B, Taylor JB (1994) *Biochem J* **300**: 271-276
35. Hussey AJ, Hayes JD (1992) *Biochem J* **286**: 929-935
36. Tan KL, Webb GC, Baker RT, Board PG (1995) *Genomics* **25**: 381-387
37. Foley V, Sheehan D (1998) *Biochem J* **333**: 839-845
38. Suzuki T, Johnston PN, Board PG (1993) *Genomics* **18**: 680-686
39. Rozen F, Nguyen T, Pickett CB (1992) *Arch Biochem Biophys* **292**: 589-593
40. Board PG, Webb GC (1987) *Proc Natl Acad Sci USA* **84**: 2377-2381
41. Rohrdanz E, Nguyen T, Pickett CB (1992) *Arch Biochem Biophys* **298**: 747-752
42. Suzuki T, Smith S, Board PG (1994) *Biochem Biophys Res Commun* **200**: 1665-1671
43. Fotouchi-Ardani N, Batist G (1999) *Biochem J* **339**: 685-693
44. Coles BF, Morel F, Rauch C, Huber WW, Yang M, Teitel CH, Green B, Lang NP, Kadlubar FF (2001) *Pharmacogenetics* **11**: 663-669
45. Tetlow N, Liu D, Board P (2001) *Pharmacogenetics* **11**: 609-617
46. Laisney V, Nguyen Van Cong, Gross MS, Parisi I, Foubert C, Weil D, Frezal J (1983) *Ann Genet* **26**: 69-74
47. Ali-Osman F, Akande O, Antoun G, Mao JX, Bulamwini J (1997) *J Biol Chem* **272**: 10004-10012
48. Cowell IG, Dixon KH, Pemble SE, Ketterer B, Taylor JB (1988) *Biochem J* **255**: 79-83
49. Morrow CS, Cowan KH, Goldsmith ME (1989) *Gene* **75**: 3-11
50. Harada S, Nakamura T, Misawa S (1994) *Hum Gen* **93**: 223-224
51. Lo HW, Ali-Osman F (1997) *J Biol Chem* **272**: 32743-32749
52. Lo HW, Ali-Osman F (1998) *Chem Biol Interact* **111-112**: 91-102
53. Xia C, Taylor JB, Spencer SR, Ketterer B (1993) *Biochem J* **292**: 845-850
54. Xia C, Hu J, Ketterer B, Taylor JB (1996) *Biochem J* **315**: 155-161
55. Matthias C, Bockmühl U, Jahnke V, Harries LW, Wolf CR, Jones PW, Alldersea J, Worrall SF, Hand P, Fryer AA, Strange RC (1998) *Pharmacogenetics* **8**: 1-6
56. Ryberg D, Skaug V, Hewer A, Phillips DH, Harries LW, Wolf CR, Ogreid D, Ulvik A, Vu P, Haugen A (1997) *Carcinogenesis* **18**: 1285-1289
57. Strange RC, Spiteri MA, Ramachandran S, Fryer AA (2001) *Mut Res* **482**: 21-26
58. De Jong JL, Chang CM, Whang-Peng J, Knutsen T, Tu CP (1988) *Nucleic Acids Res.* **16**: 8541-8554
59. Zhong S, Wolf CR, Spurr NK (1992) *Hum Genet* **90**: 435-439
60. De Jong JL, Mohandas T, Tu CP (1991) *Biochem Biophys Res Commun* **180**: 15-22
61. Ross VL, Board PG, Webb GC (1993) *Genomics* **18**: 87-91
62. Pearson WR, Vorachek WR, Xu SJ, Berger R, Hart I, Vannais D, Patterson D (1993) *Am J Hum Genet* **53**: 220-233
63. Xu S, Wang Y, Roe B, Pearson WR (1998) *J Biol Chem* **273**: 3517-3527
64. Islam MQ, Platz A, Spier J, Szpirer L, Levan G, Mannervik B (1989) *Hum Gen* **82**: 338-342
65. Taylor JB, Oliver J, Sherrington R, Pemble SE (1991) *Biochem J* **274**: 587-593
66. Nakajima T, Elovaara E, Anttila S, Hirvonen A, Camus AM, Hayes JD, Ketterer B, Vainio H (1995) *Carcinogenesis* **16**: 707-711
67. Mc Lellan RA, Oscarson M, Alexandrie AK, Seidegird J, Evans DA, Rannug A, Ingelman-Sundberg M (1997) *Mol Pharmacol* **52**: 958-965
68. Strange RC, Matharoo B, Faulder GC, Jones P, Cotton W, Elder JB, Deakin M (1991) *Carcinogenesis* **12**: 25-28
69. van Poppel G, de Vogel N, van Balderen PJ, Kok FJ (1992) *Carcinogenesis* **13**: 303-305
70. Seidegird J, Pero RW, Miller DG, Beattie EJ (1986) *Carcinogenesis* **7**: 751-753
71. Seidegird J, Pero RW, Markowitz MM, Roush G, Miller DG, Beattie EJ (1990) *Carcinogenesis* **11**: 33-36
72. Bell DA, Taylor JA, Paulson DF, Robertson CN, Mohler JL, Lucier GW (1993) *Natl Cancer Inst* **85**: 1159-1164
73. Chenevix-Trench G, Young J, Coggan M, Board P (1995) *Carcinogenesis* **16**: 1655-1657
74. McWilliams JE, Sanderson BJ, Harris EL, Richert-Boe KE, Henner WD (1995) *Cancer Epidemiol Biomarkers Prevent* **4**: 589-594
75. Trizna Z, Clayman GL, Spitz MR, Briggs KL, Goepfert H (1995) *Am J Surg* **170**: 499-501
76. Zhong S, Wyllie AH, Barnes D, Wolf CR, Spurr NK (1993) *Carcinogenesis* **14**: 1821-1924
77. Evans DA, Seidegird J, Narayanan N (1996) *Pharmacogenetics* **6**: 365-367
78. Stroombergen MC, Waring RH (1999) *Hum Exp Toxicol* **18**: 141-145
79. Wu D, Wang X, Chen D, Niu T, Ni J, Liu X, Xu X (2000) **11**: 648-653
80. Karahakil B, Sardas S, Kocabas NA, Alhayiroglu E, Karakaya AE, Civelek E (2002) *Mut Res* **515**: 135-140
81. Duncan H, Swan C, Green J, Jones P, Brannigan K, Alldersea J, Fryer AA, Strange RC (1995) *Clin Chim Acta* **240**: 53-61
82. Ivaschenko TE, Sideleva OG, Baranov VS (2002) *J Mol Med* **80**: 39-43
83. Wilton MH, Grant PJ, Hardie LJ, Wild CP (2000) *FASEB J* **14**: 791-796
84. Yengi L, Inskip A, Gilford J, Alldersea J, Bailey L, Smith A, Lear JT, Heagerty AH, Bowers B, Hand P, Hayes JD, Jones PW, Strange RC, Fryer AA (1996) *Cancer Res* **56**: 1974-1977
85. Matthias C, Jahnke V, Hand P, Fryer AA, Strange RC (1997) *Europ J Cancer* **33**: S183
86. Jahnke V, Matthias C, Fryer AA, Strange R (1996) *Am J Surgery* **172**: 671-673
87. Webb G, Vaska V, Coggan M, Board PG (1996) *Genomics* **33**: 121-123
88. Sprenger R, Schlagenhauser R, Kerb R, Bruhn C, Brockmüller J, Roots I, Brinkmann U (2000) *Pharmacogenetics* **10**: 557-565
89. Nelson HH, Wiencke JK, Christiani DC, Cheng TJ, Zuo ZF, Schwartz BS, Lee BK, Spitz MR, Wang M, Xu X (1995) *Carcinogenesis* **16**: 1243-1245
90. Shen J, Lin G, Yuan W, Tan J, Bolt HM, Thier R (1998) *Arch Toxicol* **72**: 456-458
91. Abdel-Rahman SZ, el-Zein RA, Anwar WA, Au WW (1996) *Cancer Lett* **107**: 229-233
92. Chen CL, Liu Q, Relling MV (1996) *Pharmacogenetics* **6**: 187-191
93. Saarikoski ST, Vopo A, Reinikainen M, Anttila S, Karjalainen A, Malaveille C, Vainio H, Husgafvel-Pursiainen K, Hirvonen A (1998) *Int J Cancer* **77**: 516-521
94. Jourenkova-Mironova N, Voho A, Bouchardy C, Wikman H, Dayer P, Benhamou S, Hirvonen A (1999) *Int J Cancer* **31**: 44-48
95. Tasa G, Juronen E, Viikmaa M, Tiidla A, Parlist P, Uuskula M, Kalev I, Mikelsaar AV (1996) *Gene Geogr* **10**: 181-189

96. Oke B, Akbas F, Aydin M, Berkkan H (1998) *Arch Toxicol* 72: 454-455
97. Lee EJ, Wong JY, Yeoh PN, Gong NH (1995) *Pharmacogenetics* 5: 332-334
98. Arruda VR, Grignolli CE, Goncalves MS, Soares MC, Menezes R, Saad ST, Costa FF (1998) *Clin Genet* 54: 210-214
99. Kargas Ch, Krupa R, Walter Z (2003) *Hum Biol* 75: 301-307
100. Chen H, Sandler DP, Taylor JA, Shore DL, Liu E, Bloomfield CD, Bell DA (1996) *Lancet* 347: 295-297
101. Strange RC, Jones PW and Fryer AA (2000) *Toxicol Lett* 112: 357-363
102. Hayes JD and Strange RC (2000) *Pharmacology* 61: 154-166
103. Elekpuru-Camiruaga J, Buxton N, Kandula V, Dias PS, Campbell D, McIntosh J, Broome J, Jones P, Inskip A, Alldersea J, i wsp. (1995) *Cancer Res* 55: 4237-4239
104. Brockmüller J, Cascorbi I, Kerb R, Roots I (1996) *Cancer Res* 56: 3915-3925
105. Kelsey KT, Spitz MR, Zuo ZF, Wiencke JK (1997) *Cancer Causes Control* 8: 554-559
106. Bruning T, Lammert M, Kempkes M, Thier R, Golka K, Bolt HM (1997) *Arch Toxicol* 71: 596-599
107. Cheng L, Sturgis EM, Eicher SA, Char D, Spitz MR, Wei Q (1999) *Int J Cancer* 84: 220-224
108. Naoe T, Tagawa Y, Kiyoi H, Kodera Y, Miyawaki S, Asou N, Kuriyama K, Kusumoto S, Shimazaki C, Saito K, Akiyama H, Motoji T, Nishimura M, Shinagawa K, Ueda R, Saito H, Ohno R (2002) *Leukemia* 16: 203-208
109. Taioli E, Mari D, Franceschi C, Bonafe M, Monti D, Bertolini S, Marinelli D, Garte S (2001) *Biochem Biophys Res Commun* 280: 1389-1392
110. Scarpato R, Hirvonen A, Migliore L, Falck G, Norppa H (1997) *Mutat Res* 389: 227-235
111. Liu YH, Taylor J, Linko P, Lucier GW, Thompson CL (1991) *Carcinogenesis* 12: 2269-2275
112. Shields PG, Bowman ED, Harrington AM, Doan VT, Weston A (1993) *Cancer Res* 53: 3486-3492
113. Kato S, Bowman ED, Harrington AM, Blomeke B, Shields PG (1995) *J Natl Cancer Inst* 87: 902-907
114. To-Figueras J, Gené M, Gómez-Catalán J, Galan MC, Fuentes M, Ramon JM, Rodamilans M, Huguet E, Corbella J (1997) *Carcinogenesis* 18: 1529-1533
115. Grinberg-Funes RA, Singh VN, Perera FP, Bell DA, Young TL, Dickey C, Wang LW, Santella RM (1994) *Carcinogenesis* 15: 2449-2454
116. Ryberg D, Hewer A, Phillips DH, Haugen A (1994) *Cancer Res* 54: 5801-5803
117. Alexandrie AK, Sundberg MI, Seidegrd J, Tornling G, Rannug A (1994) *Carcinogenesis* 15: 1785-1790
118. Allan JM, Wild CP, Rollinson S, Willett EV, Moorman AV, Dovey GJ, Roddam PL, Roman E, Cartwright RA, Morg GJ (2001) *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 11592-11597
119. Brockmüller J, Kerb R, Drakoulis N, Staffeldt B, Roots I (1994) *Cancer Res* 54: 4103-4111
120. Heagerty AHM, Fitzgerald D, Smith A, Bowers B, Jones P, Fryer AA, Zhao L, Alldersea J, Strange RC (1994) *Lancet* 343: 266-268
121. Sorsa M, Osterman-Golkar S, Peltonen K, Sarikoski ST, Sram R (1996) *Toxicology* 113: 77-83
122. Duell EJ, Holly EA, Bracci PM, Liu M, Wiencke JK, Kelsey KT (2002) *J Natl Cancer Inst* 94: 297-306
123. Autrup JL, Peter HB, Pedersen L, Autrup H (2002) *Europ J Pharmacol* 438: 15-18
124. Matthey DL, Hutchinson D, Dawes PT, Nixon NB, Clarke S, Fisher J, Brownfield A, Alldersea J, Fryer AA, Strange RC (2002) *Arthritis Rheum* 46: 640-646
125. Kihara M, Kihara M, Noda K (1994) *Carcinogenesis* 15: 415-418
126. Jourenkova N, Reinikainen M, Bouchardy C, Dayer P, Benhamou S, Hirvonen A (1998) *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 7: 19-23
127. Anwar WA, Abdel-Rahman SZ, El-Zein RA, Mostafa HM, Au WW (1996) *Carcinogenesis* 17: 1923-1929
128. Katoh T, Inatomi H, Nagaoka A, Sugita A (1995) *Carcinogenesis* 16: 655-657
129. Harries LW, Stubbins MJ, Forman D, Howard GC, Wolf CR (1997) *Carcinogenesis* 18: 641-644
130. Katoh T, Nagata N, Kuroda Y, Itoh H, Kawahara A, Kuroki N, Ookuma R, Bell DA (1996) *Carcinogenesis* 17: 1855-1859
131. Lin HJ, Probst-Hensch NM, Ingles SA, Han CY, Lin BK, Lee DB, Frankl HD, Lee ER, Longnecker MP, Haile RW (1995) *Cancer Res* 55: 1224-1226
132. Fontana X, Peyrotte I, Valente E, Rossi C, Etторе F, Namer M, Bussiere F (1997) *Cancer* 84: 35-40
133. Lear JT, Heagerty AHM, Smith AG, Bowers B, Payne CR, Smith CA, Jones PW, Gilford J, Yengi L, Alldersea J, Fryer AA, Strange RC (1996) *Carcinogenesis* 17: 1891-1896
134. Lear JT, Smith AG, Heagerty AHM, Bowers B, Jones PW, Gilford J, Alldersea J, Strange RC, Fryer AA (1997) *Carcinogenesis* 18: 1499-1503
135. Heagerty AHM, Smith AG, English J, Lear J, Perkins W, Bowers B, Jones P, Gilford J, Alldersea J, Fryer A, Strange RC (1996) *Br J Cancer* 73: 44-48
136. Dixon KH, Cowell IG, Xia CL, Pemble SE, Ketterer B, Taylor JB (1989) *Biochem Biophys Res Commun* 163: 815-822
137. Lammie GA, Peters G (1991) *Cancer Cells* 3: 413-420
138. Saint-Ruf C, Malfoy B, Scholl S, Zafrani B, Dutrillaux B (1991) *Oncogene* 6: 403-406

Charakterystyka immunoglobulinopodobnych receptorów leukocytów (ILT)

The characteristics of ILT receptors

ANDRZEJ WIŚNIEWSKI

Spis treści:

- I. Wprowadzenie
- II. Nazewnictwo receptorów ILT
- III. Występowanie receptorów ILT
- IV. Organizacja genów *ILT*
- V. Struktura genów *ILT2* i *LIR6*
- VI. Regulacja ekspresji genów *ILT*
- VII. Budowa receptorów ILT
- VIII. Ligandy
- IX. Znane następstwa aktywacji receptorów ILT
- X. Domniemana fizjologiczna funkcja niektórych cząsteczek ILT

Contents:

- I. Introduction
- II. Nomenclature of ILT receptors
- III. Distribution of ILT receptors
- IV. Organization of the *ILT* genes
- V. The structure of *ILT2* and *LIR6* genes
- VI. Regulation of the *ILT* genes expression
- VII. The structure of ILT receptors
- VIII. Ligands
- IX. Known consequences of ILT receptors activation
- X. Putative physiological function of some ILT molecules

Wykaz stosowanych skrótów: FCAR — gen receptora dla fragmentu Fc IgA (FcαR); FHC — wolny łańcuch ciężki (ang. *free heavy chain*); HLA — MHC człowieka (ang. *human leukocyte antigen*); ILT — transkrypt podobny do immunoglobuliny (ang. *immunoglobulin-like transcript*); ITAM — aktywujący motyw immunoreceptorowy oparty o resztę tyrozyny (ang. *immunoreceptor tyrosine based activatory motif*); ITIM — hamujący motyw immunoreceptorowy oparty o resztę tyrozyny (ang. *immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif*); KIR — receptor komórek cytotoksycznych podobny do immunoglobuliny (ang. *killer cell immunoglobulin-like receptor*); LIR — leukocytarny receptor podobny do immunoglobuliny (ang. *leukocyte immunoglobulin-like receptor*); LRC — kompleks receptorów leukocytarnych (ang. *leukocyte receptor complex*); MHC — główny kompleks zgodności tkankowej (ang. *major histocompatibility complex*); komórka NK — naturalna komórka cytotoksyczna (ang. *natural killer cell*); SHP-1 — fosfataza tyrozynowa zawierająca domeny SH2 (ang. *SH2 domain-containing phosphotyrosine phosphatase-1*); TCR — receptor limfocytów T (ang. *T-cell receptor*); 5'UT — region 5' nie podlegający translacji (ang. *5' untranslated*);

I. Wprowadzenie

Kompleks receptorów leukocytarnych — LRC (ang. *leukocyte receptor complex*) zlokalizowany na

chromosomie 19q13.4 człowieka obejmuje trzy rodziny blisko ze sobą związanych genów kodujących immunoglobulinopodobne receptory, z których jedne aktywują, a drugie hamują określone komórki układu odpornościowego. Są nimi: geny *ILT* (ang. *immunoglobulin-like transcripts*), geny *KIR* (ang. *killer cell immunoglobulin-like receptors*) oraz geny *LAIR* (ang. *leukocyte-associated inhibitory receptors*). Oprócz tego do kompleksu LRC zalicza się 2 pojedyncze geny: *FCAR* i *NKp46* [1, 2]. Ostatnio zainteresowanie regionem LRC systematycznie rośnie. Szczególnie dotyczy to wciąż bardzo słabo poznanych receptorów ILT, które prawdopodobnie wywierają znaczny wpływ na wiele różnych populacji komórek układu odpornościowego. Do tej pory najwięcej informacji ukazało się w odniesieniu do receptora *ILT2*, nieco mniej w stosunku do *ILT4*. Głównie przyczyniło się do tego ustalenie, z jakimi ligandami łączą się owe receptory. O ligandach, a tym samym o funkcji i znaczeniu pozostałych ILT, nic nie wiadomo. Celem tego artykułu jest przybliżenie aktualnego stanu wiedzy o leukocytarnych receptorach ILT, a w szczególności o ich budowie, strukturze kodujących je genów, występowaniu, następstwach ich aktywacji oraz domniemanej funkcji fizjologicznej niektórych z nich.

Mgr; Laboratorium Immunogenetyki, Zakład Immunologii Klinicznej, Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN im. Ludwika Hirszfelda, ul. Rudolfa Weigla 12, 53-114 Wrocław; e-mail: andrzej@immuno.iitd.pan.wroc.pl

II. Nazewnictwo receptorów ILT

Receptory ILT określane są także dodatkowymi nazwami: LIR (ang. *leukocyte immunoglobulin-like receptors*) [3], LILR (ang. *leukocyte immunoglobulin-like receptors*) [4] i MIR (ang. *monocyte/macrophage Ig-related receptors*) [5]. Ostatnia z nazw jest obecnie rzadko stosowana i można się z nią spotkać jedynie we wcześniejszych opracowaniach dotyczących kompleksu LRC. Dość kłopotliwe jest spotykane w niektórych publikacjach zamienne stosowanie nazw ILT i LIR w odniesieniu do określonych receptorów, ponieważ nie wszystkie receptory określane jako ILT mają swoje odpowiedniki w terminologii LIR i odpowiednio nie wszystkie receptory określane jako LIR posiadają alternatywną nazwę ILT. Próba uporządkowania nomenklatury receptorów leukocytarnych, którym poświęcona jest ta praca, jest określenie ich skrótami LILRA lub LILRB, które opatrzone są dodatkowo odpowiednim indeksem cyfrowym precyzującym o który receptor chodzi. Litera A i B określają czy mamy do czynienia odpowiednio z receptorem aktywującym czy też hamującym. Jako że skróty LILR nie są jeszcze w powszechnym użyciu, a wielu autorów stosuje nadal stare nazwy, w poniższej pracy dla uproszczenia będzie stosowany skrót ILT. W tabeli 1 dokonano usystematyzowania wszystkich skrótów, jakie pojawiły się do tej pory w literaturze i internetowych bazach danych odnoszących się do poszczególnych receptorów ILT.

III. Występowanie receptorów ILT

Immunoglobulinopodobne receptory leukocytów — ILT są niedawno odkrytą rodziną immunoreceptorów występujących na monocytach, makrofagach, komórkach B oraz w mniejszym stopniu na komórkach dendrytycznych, komórkach NK i komórkach T. Wykorzystując technikę RT-PCR zbadano poziom ekspresji niektórych genów *ILT* w wyżej wymienionych typach komórek. Okazało się, że ekspresja poszczególnych genów w dużej mierze jest uzależniona od typu komórki. Większość z przebadanych w ten sposób transkryptów (*ILT2*, *ILT3*, *ILT4*, *ILT5* i *LIR6*) występuje głównie w monocytach i/lub komórkach B [3]. Na przykład gen dla receptora *ILT2* ulega wysokiej ekspresji we wszystkich limfocytach B i monocytach natomiast jego ekspresja w limfocytach T i komórkach NK jest stosunkowo niska [6, 7, 8]. O ile ekspresja *ILT2*, *ILT4* i *ILT5* w komórkach dendrytycznych jest wykrywalna lecz niewielka, ekspresja *ILT3* w tych komórkach jest szczególnie wysoka. Z

uwagi na to, że znaczny poziom ekspresji *ILT3* występuje także w monocytach i komórkach B, można stwierdzić, że ekspresja tego genu jest wyjątkowo wysoka w komórkach specjalizujących się w prezentacji antygenów. Pomiar ekspresji genów *ILT* w komórkach NK wykazał niski poziom mRNA dla *ILT2*, *ILT3*, *ILT4* i *ILT5*, nieco wyższy dla *ILT6* i bardzo wysoki dla *LIR8*, którego ekspresja wydaje się być ograniczona do komórek NK. Zaobserwowany, stosunkowo niski poziom ekspresji testowanych genów w komórkach NK (wyjątek stanowi *LIR8*) i komórkach T może być spowodowany tym, że jedynie niektóre podklasy tych komórek posiadają na swojej powierzchni określone receptory ILT, jak to wykazano dla *ILT2* [3].

Dwa z genów *ILT*, a mianowicie *ILT9* i *ILT10* prawdopodobnie nie ulegają ekspresji (badania prowadzono na komórkach szpiku oraz leukocytach krwi obwodowej) co sugeruje, że mogą być pseudogenami [9].

W badaniach nad występowaniem receptorów ILT, oprócz pomiaru poziomu poszczególnych transkryptów w określonych typach komórek układu odpornościowego, zbadano także ekspresję niektórych receptorów na powierzchni tych komórek. Badania takie prowadzono głównie dla *ILT2* i *ILT4*. Okazuje się, że różnice w ilości mRNA dla tych receptorów (uzależnione od typu komórki) w zasadzie przekładają się na różnice w ilości białka mierzonego na powierzchni komórek. *ILT2* ulega ekspresji na 97% komórek B (CD19⁺), 22% komórek NK (CD 56⁺) i na niewielkim procencie limfocytów T (CD 3⁺), podczas gdy powierzchniowa ekspresja *ILT4* na wymienionych typach komórek występuje na granicy detekcji. W przeciwieństwie do tego oba receptory występują na powierzchni wszystkich monocytów i na znacznym odsetku komórek dendrytycznych [8].

Wyniki wielu doświadczeń wykazały, że w rodzinie ILT występuje zjawisko alternatywnego składowania mRNA, co w praktyce przekłada się na znaczną liczbę izoform określonych białek receptorowych. Na przykład w monocytach i komórkach B powstają transkrypty kodujące odpowiednio cztery (*LIR6a*) i dwie (*LIR6b*) domeny immunoglobulinopodobne. Dodatkowo w monocytach wykryto dwa inne transkrypty o pośredniej długości, które prawdopodobnie kodują izoformy *LIR6* zawierające mniej niż 4 domeny (dokładna długość transkryptów nie jest znana). Poza tym w komórkach B i NK powstają także dwa różniące się długością transkrypty, wykrywane przez startery specyficzne dla *ILT6*, co wskazuje na istnienie dwóch izoform tego receptora [3].

Tabela 1

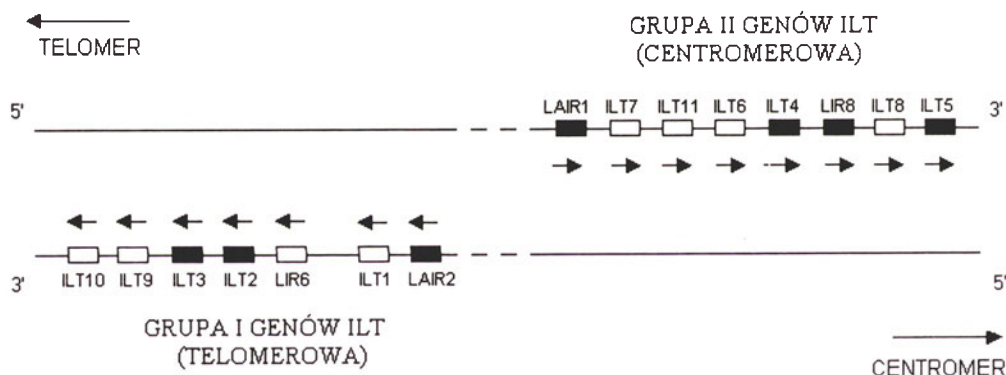
Zestawienie nazewnictwa receptorów ILT

ILT	LIR	LILR	INNE
ILT1	LIR7	LILRA2	CD85h
ILT2	LIR1	LILRB1	MIR-7/CD85j
ILT3	LIR5	LILRB4	HM18/CD85k
ILT4	LIR2	LILRB2	MIR-10/CD85d
ILT5	LIR3	LILRB3	HL9/CD85a
<u>ILT6</u>	<u>LIR4</u>	<u>LILRA3</u>	HM43, HM31, CD85e
ILT7	—	—	CD85g
ILT8	—	—	CD85b
ILT9	—	—	CD85l
ILT10	—	—	CD85m
ILT11	—	—	CD85f
—	LIR6	LILRA1	CD85i
—	LIR8	LILRB5	CD85c

Czcionka zwykła — receptory aktywujące, czcionka pogrubiona — receptory hamujące, podkreślone — receptor rozpuszczalny

Występowanie alternatywnych form transkryptów *ILT* zostało także poparte klonowaniem i sekwencjonowaniem 3 różnych cząsteczek cDNA *ILT1* oznaczonych jako *ILT1a/b/c*. W *ILT1a* brakuje części se-

centromerowa obejmująca geny *LAIR1*, *ILT7*, *ILT11*, *ILT6*, *ILT4*, *LIR8*, *ILT8* i *ILT5* ma orientację przeciwną tzn. 5'-3' w kierunku od telomeru do centromeru (Ryc. 1). Taka orientacja warunkuje przeciwny

Ryc. 1. Rozmieszczenie loci *ILT* na chromosomie 19q13.4

kwencji kodującej peptyd sygnałny. W *ILT1b* wycięciu ulega fragment kodujący drugą, trzecią oraz część czwartej domeny zewnątrzkomórkowej. Natomiast produkt białkowy powstający na matrycy mRNA *ILT1c* pozbawiony jest osiemnastu aminokwasów wchodzących w skład regionu sąsiadującego z domeną transmembranową [10].

IV. Organizacja genów *ILT*

Geny *ILT* występują w dwóch grupach: telomerowej — I, która zawiera 6 genów *ILT* i jeden gen *LAIR2* oraz centromerowej — II, zawierającej 7 genów *ILT* i gen *LAIR1*. Grupa telomerowa obejmująca w kolejności geny *LAIR2*, *ILT1*, *LIR6*, *ILT2*, *ILT3*, *ILT9* i *ILT10* znajduje się w orientacji 5'-3' w kierunku od centromeru do telomeru, podczas gdy grupa

kierunek transkrypcji genów w obu grupach. Odległości pomiędzy genami wewnątrz grup wahają się od około 6 kpz do około 25 kpz. Wyjątek stanowi *locus LAIR2* oddalone od *locus ILT1* o około 50 kpz. Odległość dzieląca obie grupy wynosi w przybliżeniu 200 kpz (Ryc. 1).

Analizy prowadzone przy pomocy metody dot-matriks wykazały wysoką homologię nukleotydów pomiędzy obiema grupami genów *ILT*. Okazało się, że duży region (ok. 45 kpz) w grupie I, rozciągający się pomiędzy *LIR6* a *ILT2* jest wysoce homologiczny do podobnego rozmiarami regionu w grupie II (*ILT6* — *ILT4*). Sekwencje otaczające homologiczne regiony nie są już tak bardzo do siebie podobne. W oparciu o wykrytą homologię oraz przeciwną orientację genów w obu grupach wysunięto hipotezę, według której centromerowa grupa genów *ILT* powstała na sku-

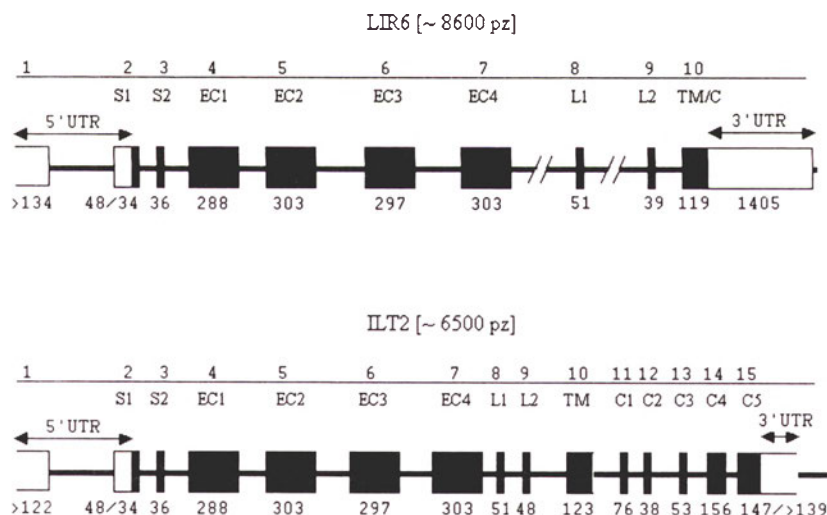
tek odwróconej duplikacji pierwotnej, telomerowej grupy genów. Analizy dot-matrixs sugerują również, że przodkiem wszystkich trzynastu genów *ILT* jest prawdopodobnie *LIR6* kodujący receptor aktywujący. Z niego przez duplikację powstał *ILT2*, który następnie uległ zmianie w kierunku genu dla receptora hamującego. Kolejne duplikacje doprowadziły do powstania z *LIR6* kilku innych genów dla receptorów aktywujących, a z *ILT2* kilku innych genów dla receptorów hamujących [1, 11, 12]

Region obejmujący geny *ILT* jest bardzo podobny w różnych haplotypach. Prowadzone do tej pory badania wykazały, że prawie wszyscy posiadamy wszystkie geny *ILT*. Wyjątek stanowi leżący w grupie centromerowej gen *ILT6*, którego nie wykryto u niektórych osobników. Za brak genu odpowiedzialna jest u nich delecja, która obejmuje swym zasięgiem większą część *locus ILT6* [1, 13].

V. Struktura genów *ILT2* i *LIR6*

Gen *ILT2* posiada 6500 pz i zawiera 15 eksonów rozdzielonych 14 intronami, odpowiednio gen *LIR6* składa się z 8600 pz i zawiera 10 eksonów i 9 intro-

ny (S1 i S2). Pierwszy z nich zawiera w sobie region 5' UT oraz 34 pz sekwencji kodującej, natomiast drugi, zwany czasami mini-eksonem, zawiera 36 pz kodujących drugą część peptydu sygnałowego. We wszystkich genach należących do LRC każda domena immunoglobulinopodobna (Ig) jest kodowana przez oddzielny ekson. Interesującym jest, że w organizacji genów *ILT2* i *LIR6* kodujących receptory o odmiennych funkcjach, zasadnicze różnice występują dopiero za eksonem EC4 kodującym ostatnią domenę Ig (D4). Oba geny są prawie identyczne (podobieństwo 92%) biorąc pod uwagę sekwencje eksonów i intronów leżących w regionie rozciągającym się od -680 pz przed kodonem start (ATG) aż do początku intronu znajdującego się za eksonem dla D4. Od tego punktu sekwencja i struktura obu genów zaczynają się znacznie różnić. Znajduje to swoje odzwierciedlenie w sekwencji i strukturze białek kodowanych przez te geny. W receptorze *ILT2* region znajdujący się pomiędzy domeną D4 a domeną transmembranową — region łączący (ang. *stalk region*) kodowany jest przez 2 eksony (L1 i L2), z których pierwszy koduje 17 a drugi 16 aminokwasów. Sąsiadujące z tymi eksonami introny (7 i 8) są krótkie (od



Ryc. 2. Struktura genów *LIR6* i *ILT2*. 5'UTR, 3'UTR — regiony nie podlegające translacji; S1, S2 — eksony peptydu sygnałowego; EC1, EC2, EC3, EC4 — eksony domen immunoglobulinopodobnych; L1, L2 — eksony dla regionu łączącego; TM — ekson domeny transmembranowej; C — eksony domeny cytoplazmatycznej. Długość eksonów wyrażono w parach zasad.

nów (Ryc. 2).

Ekson pierwszy *ILT2* i *LIR6*, a także większości pozostałych *ILT* leży w regionie nie ulegającym translacji zwanym regionem 5' UT (ang. *untranslated*). W genach tych częściowej translacji podlega dopiero ekson 2. Wyjątek stanowią geny *ILT3* i *ILT10*, nie posiadające eksonu 5' UT [1, 2, 9]. Charakterystycznym dla organizacji wszystkich genów *ILT*, ale także dla genów *KIR* oraz genu *FCAR* jest fakt kodowania peptydu sygnałowego przez 2 ekso-

~ 300 do ~ 700 pz). W przypadku receptora *LIR6* region łączący także kodowany jest przez dwa eksony, z tą jednak różnicą, że ekson L2 koduje jedynie 13 aminokwasów. Dodatkowo introny 7 i 8 są bardzo długie, licząc odpowiednio 2700 i 1200 pz [2]. Na marginesie należy dodać, że region łączący w receptorze *ILT10* inaczej niż w pozostałych receptorach *ILT* kodowany jest przez pojedynczy ekson, podobnie jak w receptorach *KIR* [9]. Na tym jednak nie koniec różnic w budowie genów *ILT2* i *LIR6*. W przy-

padku *ILT2*, pojedynczy ekson (TM) koduje domenę transmembranową, natomiast aż 5 eksonów (C1-C5) koduje domenę cytoplazmatyczną. Inaczej jest w *LIR6* gdzie pojedynczy, długi ekson koduje domenę transmembranową, domenę cytoplazmatyczną oraz nie ulegający translacji region 3'. Wykazano także, że obejmujący aż 1400 pz region 3' UT w *LIR6* zawiera 10 powtórzeń liczącego 37 pz motywu (5'-CATTC[G/A]CCATCTACCCTCTAGAATAA AGAAATCTTAT-3') zawierającego sekwencję AATAAA będącą sygnałem poliadenylacji. Powtórzeń tych nie znaleziono w regionie 3' UT *ILT2* oraz innych *ILT*.

Okazało się, że eksonowo-intronowa organizacja genu *ILT2* jest bardzo podobna do organizacji genu *Pir-B* u myszy, który podobnie jak *ILT2* koduje leukocytarny receptor hamujący określone komórki układu odpornościowego. Z kolei organizacja *LIR6* ma pewne wspólne cechy z organizacją genu *FCAR* człowieka. Zarówno w *LIR6* jak i we *FCAR* pojedynczy ekson koduje równocześnie domenę transmembranową, domenę cytoplazmatyczną oraz sekwencję 3' UT [2].

Podsumowując można stwierdzić, że struktura eksonów i intronów w genach hamujących i aktywujących receptorów z rodziny *ILT* (przykładem są *ILT2* i *LIR6*) jest bardzo podobna w obszarze kodującym peptyd sygnałny oraz domeny zewnątrzkomórkowe. Znaczące różnice występują przy końcach genów, gdzie znajdują się eksony kodujące domenę transmembranową i cytoplazmatyczną. Należy podkreślić, że to właśnie sekwencja i struktura tych domen decyduje o naturze wewnątrzkomórkowego sygnału (hamowanie lub aktywacja komórki) powstającego po połączeniu się receptora z ligandem [2, 9].

VI. Regulacja ekspresji genów *ILT*

W celu poznania mechanizmu regulacji ekspresji genów *ILT* określono możliwe miejsce inicjacji transkrypcji genu *ILT3*. Okazało się, że pierwszym transkrybowanym nukleotydem jest cytozyna (362 pz przed kodonem start ATG), wchodząca w skład sekwencji inicjatorowej, której głównym elementem jest dinukleotyd CA. Znajduje się on bezpośrednio za traktem złożonym z 15 reszt tyminy (-337 do -363). Analizy sekwencji flankującej gen *ILT3* od strony 5' wykazały brak w podstawowym promotorze tego genu innego ważnego elementu inicjacji transkrypcji jakim jest sekwencja TATA [2], w obrębie której odbywa się składanie kompleksu preinicjacyjnego polimerazy RNA II [15]. Wiadomo, że w

niektórych genach pozbawionych kasety TATA jej funkcję pełni sekwencja inicjatorowa oraz że ekspresja takich genów (przykładami są gen terminalnej transferazy deoksynukleotydów lub też gen receptora FcγIb), jest od niej zależna. Jest możliwe, że w przypadku genu *ILT3* to właśnie sekwencja inicjatorowa reguluje jego ekspresję [2].

VII. Budowa receptorów *ILT*

Receptory *ILT* są strukturalnie i funkcjonalnie spokrewnione z innymi immunoglobulinopodobnymi receptorami, do których należą: neutrofilowy receptor Fc dla IgG2 (Fcγ2R) u bydła, receptory gp49B1, PIR-A i PIR-B u myszy oraz receptory KIR i FcαR u człowieka [16].

Receptory *ILT* są glikoproteinami zawierającymi dwie lub cztery immunoglobulinopodobne domeny zewnątrzkomórkowe. Można je podzielić na trzy grupy:

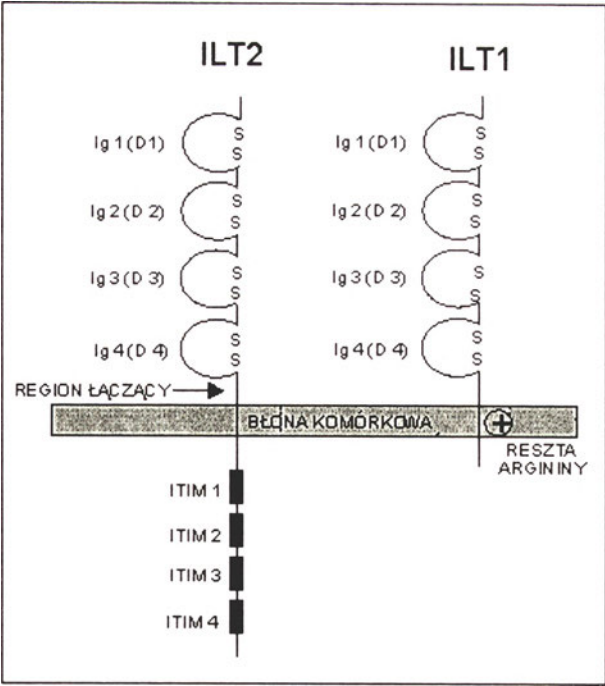
1. receptory hamujące z dwoma, trzema lub czterema motywami ITIM (ang. *immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif*), bardzo podobnymi do tych, które występują w receptorach KIR komórek NK. Hamujące działanie tych motywów oparte jest o resztę tyrozyny;
2. receptory aktywujące z krótkimi domenami cytoplazmatycznymi pozbawionymi motywów ITIM;
3. cząsteczki rozpuszczalne nie posiadające domeny transmembranowej.

Ad.1. *ILT* należące do pierwszej grupy (*ILT2*, -3, -4, -5 i *LIR8*) charakteryzują się obecnością dwóch lub czterech domen immunoglobulinopodobnych w regionach zewnątrzkomórkowych oraz pojedynczej domeny cytoplazmatycznej zawierającej od dwóch do czterech motywów ITIM [3] (Ryc. 3), (Tab. 2).

Seqwencja motywu ITIM jest następująca: I/L/VXYXXL/V, gdzie X oznacza dowolny aminokwas. Po interakcji receptora z ligandem kluczowe dla motywów ITIM reszty tyrozyny są fosforylowane przez Src-podobne kinazy tyrozynowe. Następnie do ufosforylowanych motywów przyłącza się fosfataza tyrozynowa SHP-1 (ang. *SH2 domain-containing phosphotyrosine phosphatase-1*). Enzym ten defosforyluje molekuly odpowiedzialne za przekazanie sygnału pobudzenia do wnętrza komórki, hamuje jej aktywację. W przypadku motywów ITIM obecnych w hamujących receptorach KIR, hydrofobowa reszta aminokwasowa w pozycji -2 przed tyrozyną jest niezbędna do przyłączenia domen SH2 fosfatazy. Do niedawna uważano, że podobnie jest także w przypadku receptorów *ILT*. Jednak ostatnie

badania prowadzone nad motywami ITIM w ILT2 wykazały, że jeden z nich pomimo iż posiada hydrofilną resztę seryny w pozycji -2, efektywnie wiąże fosfatazę. Nie wszystkie motywy ITIM obecne w ogonach cytoplazmatycznych receptorów ILT pełnią taką samą funkcję (przyłączanie SHP-1). W przypadku czterech motywów obecnych w ILT2 jedynie dwa z nich o sekwencji: 612-VTYAQL-617 i 642-SIYATL-647 bezpośrednio wiążą fosfatazę. ITIM 531-NLYAAV-536 prawdopodobnie aktywuje i/lub optymalizuje fosforylację pozostałych reszt tyrozynowych, podczas gdy czwarty z motywów (560-VTYAEV-565) pomimo, iż podlega fosforylacji, to najprawdopodobniej nie bierze udziału w rekrutacji SHP-1 [17].

Ad.2. Druga grupa cząsteczek ILT obejmuje sześć białek (ILT1, ILT7, ILT8, ILT11 i LIR6a/b). Wszystkie receptory z tej grupy posiadają bardzo krótkie domeny cytoplazmatyczne pozbawione znanych motywów sekwencyjnych oraz dodatkowo naładowaną resztę argininy w regionie transmembranowym (Tab. 2) (Ryc. 3). Dodatkowo naładowany aminokwas obecny jest także w domenach transmembranowych innych, lepiej poznanych receptorów aktywujących takich jak FcαR u człowieka, IgG2FcR u bydła czy aktywujących receptorach KIR [3]. W przypadku tych ostatnich aminokwasem tym jest lizyna [18]. Wykazano, że dodatkowo naładowana reszta jest niezbędna do połączenia receptora z błonąwą cząsteczką adaptorową, która bierze udział w zapoczątkowaniu wewnątrzkomórkowej kaskady przenoszącej sygnał aktywacji. Na przykład ludzki FcαR



Ryc. 3. Struktura receptorów ILT na przykładzie ILT2 i ILT1. Ig(D) — domeny immunoglobulinopodobne, ITIM — hamujący motyw immunoreceptorowy oparty o resztę tyrozyny, ⊕ — schematycznie zaznaczony dodatnio naładowany aminokwas.

wchodzi w kompleks z łańcuchem FcRγ. Cząsteczka ta nazywana jest czasami „wspólnym łańcuchem γ” ponieważ wchodzi także w skład FcγRIIIA, FcεRI oraz niektórych kompleksów CD3. Cząsteczką adaptorową dla aktywujących receptorów KIR jest natomiast DAP12 (ang. *dnax-activation protein 12*) [18, 19]. Kompleksy FcαR-FcRγ oraz KIR-DAP12 są od-

Tabela 2

Przedstawienie niektórych cech receptorów ILT/LIR

Receptor	Liczba domen immunoglobulinopodobnych	Elementy odpowiedzialne za charakter receptora — reszta argininy / motywy ITIM	Ligand
ILT1	4	Reszta argininy	Nieznany
ILT2	4	4 motywy ITIM	HLA-A2,-A0101,-A0301,-B0702,-B0801,-B1501,-B2702,-B2705,-B44,-Cw0304,-G1
ILT3	2	3 motywy ITIM	Nieznany
ILT4	4	3 motywy ITIM	HLA-A0201,-A0301,-B0702,-B0801,-B1501,-B2705,-B3501,-Cw0304,-G1
ILT5	4	4 motywy ITIM	Nieznany
ILT6	4	Brak (receptor rozpuszczalny)	Nieznany
ILT7	4	Reszta argininy	Nieznany
ILT8	4	Reszta argininy	Nieznany
ILT11	2	Reszta argininy	Nieznany
LIR6a	4	Reszta argininy	HLA-B27
LIR6b	2	Reszta argininy	
LIR8	4	2 motywy ITIM	Nieznany

powiedzialne za przekazanie sygnału aktywującego komórkę w co bezpośrednio są zaangażowane immunoreceptorowe motywy oparte o tyrozynę — ITAM (ang. *immunoreceptor tyrosine-based activation motif*) wchodzące w skład FcR γ i DAP12 [19, 20]. Motywy te mają budowę tandemową a ich sekwencja wygląda następująco: YXX(L/I) (X)₆₋₈ YXX(L/I) [21]. W przypadku aktywujących receptorów ILT udało się ustalić, że z łańcuchem FcR γ łączy się receptor ILT1. Nic natomiast nie wiadomo o cząsteczkach adaptorowych dla pozostałych domniemyanych aktywatorów z tej rodziny. Przypuszcza się jednak, że i one łączą się z łańcuchem FcR γ [18].

Ad.3. Do trzeciej grupy cząsteczek ILT zalicza się tylko receptor ILT6. Cząsteczka ta zawiera cztery domeny zewnątrzkomórkowe nie posiadając jednocześnie domeny transmembranowej. A zatem jest to prawdopodobnie receptor rozpuszczalny. Doświadczalnie wykazano, że ILT6 jest wydzielany przez komórki CV1/EBNA transfekowane wektorem ekspresyjnym zawierającym gen *ILT6*. Wyniki te nie zostały jednak opublikowane. Cząsteczka taka jak ILT6 może potencjalnie pełnić funkcję receptora dominującego, który mógłby blokować działanie innych ILT wiążąc te same ligandy [1, 3].

VIII. Ligandy

Do chwili obecnej stwierdzono, że dla trzech receptorów ILT (ILT2, ILT4 i LIR6) ligandami są cząsteczki MHC klasy I [8, 22, 23] (Tab. 2). Ligandy dla innych cząsteczek z rodziny ILT nie zostały jeszcze poznane. Być może są nimi cząsteczki MHC klasy I kodowane przez rzadko występujące allele, cząsteczki MHC klasy II lub też immunoglobuliny [3]. Na podstawie prowadzonych eksperymentów z cząsteczkami MHC I można stwierdzić, że dany receptor ILT może wiązać kilka a nawet kilkanaście różnych ligandów. Na przykład ILT2 rozpoznaje 11 różnych cząsteczek MHC (Tab. 2). Za wiązanie ligandu przez ILT2 odpowiedzialna jest immunoglobulinopodobna domena D1. Domena ta łączy się z konserwatywną domeną $\alpha 3$ cząsteczek MHC. W jednym z doświadczeń wykazano także, że ILT2 wiąże się z białkiem UL18, produkowanym przez ludzki wirus cytomegalii (HCMV) [24]. Białko to będąc homologiem cząsteczek MHC I, podobnie jak one wiąże dostępną w komórce $\beta 2$ -mikroglobulinę i ulega wbudowaniu w błonę komórkową [25]. Co ciekawe, powinowactwo ILT2 do UL18 jest znacznie większe niż powinowactwo ILT2 do rozpoznawanych cząsteczek MHC [24]. Przypuszcza się, że związanie UL18 obecnego na zainfekowanej komórce przez re-

ceptor ILT2 komórek NK może generować sygnał hamujący te komórki, a tym samym zainfekowana wirusem komórka może uniknąć lizy [3].

ILT2 oprócz klasycznych cząsteczek MHC rozpoznaje także cząsteczki nieklasyczne — HLA-G1 (Tab. 2) [3, 26, 27].

ILT4, który ulega selektywnej ekspresji na komórkach linii mieloidalnej (głównie na monocytach), także oprócz szerokiego wachlarza klasycznych cząsteczek MHC I, wiąże HLA-G1 (Tab. 2). Podobne badania prowadzono także dla ILT5, jednak nie wykazano aby receptor ten wiązał cząsteczki MHC I wykorzystane w eksperymencie [22]. Nie jest jednak wykluczone, że ILT5 rozpoznaje inne cząsteczki MHC. W doświadczeniach nad oddziaływaniem receptorów ILT2 i ILT4 z MHC I ustalono ponadto, że wiążą one wspólne dla nich ligandy z podobną siłą. Warto dodać, że oba receptory silniej wiążą cząsteczki HLA-B niż HLA-A lub HLA-C [8].

Ciekawe okazały się także wyniki badań, w których testowano możliwość wiązania się niektórych receptorów ILT (ILT1, ILT2, ILT3, ILT4, ILT5, ILT7 i LIR6) z cząsteczką HLA-B27, której występowanie wiąże się ze zwiększonym ryzykiem rozwoju zesztywniającego zapalenia stawów kręgosłupa [4]. Wiadomo, że cząsteczki HLA klasy I mogą występować na powierzchni komórki bądź jako heterodimery będące połączeniem łańcucha ciężkiego H i $\beta 2$ -mikroglobuliny (β_2m), które efektywnie prezentują peptydy limfocytom T, bądź jako wolne łańcuchy H — FHC (ang. *free h chains*). FHC przeważnie powstają na powierzchni komórki w wyniku dysocjacji heterodimerów i są nieaktywne funkcjonalnie, co oznacza, że nie są w stanie prezentować antygenów limfocytom T [28]. W przeciwieństwie do tego ogólnego schematu wolne łańcuchy HLA-B27 (HC-B27), dzięki obecności cysteiny (Cys⁶⁷) w ich zewnątrzkomórkowej domenie $\alpha 1$, występują na powierzchni komórki w postaci homodimerów połączonych wiązaniem dwusiarczkowym. Co ciekawe, w przypadku mysich komórek transfekowanych genem *HLA-B27* udowodniono, że homodimery HLA-B27 są w stanie prezentować peptyd. Wiadomo także, że forma HC-B27 może w bliżej nieznanym sposobie przyczyniać się do zapalenia stawów u transgenicznych myszy pozbawionych możliwości syntezy $\beta 2$ -mikroglobuliny [29]. W przypadku komórek ludzkich okazało się, że pozbawione $\beta 2$ -mikroglobuliny HLA-B27 (choć prawdopodobnie niezdolne do prezentacji peptydów [29]), mogą być wciąż pełnowartościowymi ligandami dla niektórych receptorów ILT. Badania prowadzone z dimerami HC-B27 wykazały, że wiążą się one do receptorów

ILT4 i LIR6, natomiast forma klasyczna HLA-B27/ β_2m jest wiązana przez ILT2, ILT4 i LIR6. Pozostaje zagadką dlaczego ILT2 pomimo iż wiąże konserwatywną domenę $\alpha 3$ cząsteczek MHC klasy I, która przecież obecna jest w HC-B27, nie rozpoznaje tej formy. Powyższe wyniki wskazują, że receptory ILT mogą odgrywać znaczącą rolę w chorobach sprzężonych z cząsteczką HLA-B27 poprzez wiązanie prawidłowo i/lub nieprawidłowo sfałdowanych struktur tej cząsteczki. Wysoki poziom ekspresji ILT4 w makrofagach będących jedną z głównych populacji komórek przenikających do zaognionych stawów dodatkowo może potwierdzać bezpośrednie zaangażowanie tego receptora w proces chorobowy [4].

IX. Znane następstwa aktywacji receptorów ILT

Jak już wcześniej wspomniano, receptor ILT1 występuje na powierzchni komórki w kompleksie z łańcuchem Fc γ R. Łańcuch ten jest homodimerem złożonym z dwóch identycznych podjednostek γ połączonych mostkiem dwusiarczkowym (γ - γ). Każda podjednostka zawiera w swojej części cytoplazmatycznej jeden motyw ITAM [19, 21]. Wciąż niewiele wiadomo o molekularnym mechanizmie aktywacji komórek przez receptor ILT1, a tym samym przez pozostałe aktywujące receptory z rodziny ILT. Jednak na podstawie danych dotyczących receptora Fc α R oraz innych receptorów aktywujących posiadających dodatnio naładowany aminokwas w domenie transmembranowej można przypuszczać, że ILT1 aktywuje komórkę dzięki połączeniu z Fc γ R. Taka aktywacja na swoim wczesnym etapie może przebiegać następująco. Po związaniu ligandu przez receptor ILT1 dochodzi do fosforylacji sekwencji ITAM łańcucha gamma. Być może tak jak w przypadku receptora Fc α R fosforylacji dokonuje Src-podobna kinaza p56^{lyn}. Zapoczątkowuje to kaskadę reakcji, skutkiem której komórka posiadająca na swojej powierzchni ILT1 ulega pobudzeniu. W przypadku monocytów i transfekowanych cDNA *ILT1* komórek RBL (ang. *rat basophilic leukemia*) wykazano, że aktywacja tych komórek przez receptor ILT1 pociąga za sobą wewnątrzkomórkowe uwalnianie jonów wapnia w monocytach oraz uwalnianie serotoniny i jonów wapnia w komórkach RBL [30, 31].

ILT2 po połączeniu się z cząsteczką MHC klasy I, w przeciwieństwie do ILT1, wyzwala negatywny sygnał, który skutecznie hamuje aktywację komórki zapoczątkowaną przez receptor aktywujący. W przypadku cytotoksycznych limfocytów T receptory

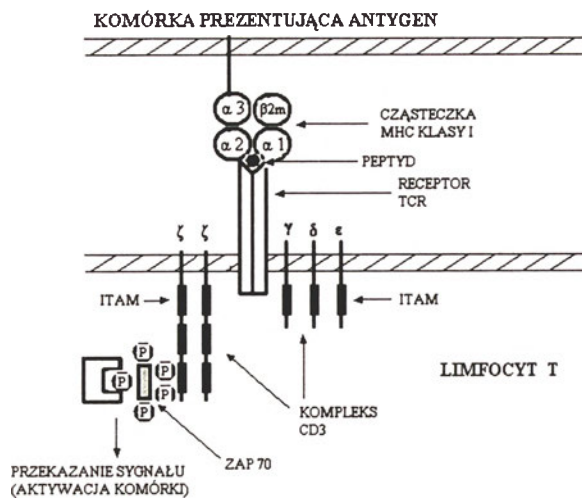
ILT2 obecne na ich powierzchni mogą hamować ich aktywację po wcześniejszym swoistym rozpoznaniu przez TCR limfocyty kompleksu MHC-peptyd [32]. Wiadomo, że w pierwszych chwilach po aktywacji limfocyty T dochodzi do uruchomienia Src-podobnych kinaz tyrozynowych Lck oraz Fyn, które fosforylują motywy ITAM zawarte w łańcuchach ζ kompleksu CD3. Kompleks ten pośredniczy w przekazaniu sygnału z TCR do wnętrza limfocyty. Fosforylacja motywów ITAM tworzy miejsca, do których przyłącza się kinaza ZAP-70. Enzym ten jest następnie dwukrotnie fosforylowany, najpierw przez kinazy Src a potem przez samego siebie (autofosforylacja). Druga fosforylacja powoduje powstanie miejsc na ZAP-70, do których przyłączają się inne białka, biorące udział w dalszym przekazaniu sygnału [21, 32] (Ryc. 4).

Co się jednak dzieje gdy w czasie aktywacji limfocyty obecne są na nim receptory ILT2, a komórka prezentująca antygen posiada na swojej powierzchni cząsteczki MHC I rozpoznawane przez ILT2? Hipoteza, która próbuje odpowiedzieć na to pytanie przewiduje, że po połączeniu cząsteczki MHC z ILT2 dochodzi do fosforylacji tyrozyn zawartych w jego motywach ITIM. Fosforylacji dokonują prawdopodobnie te same kinazy tyrozynowe co w przypadku kompleksu CD3, a więc Lck i Fyn. Do dwóch z czterech ufosforylowanych motywów ITIM przyłącza się swoimi domenami SH2 fosfataza SHP-1 [17]. Jeśli teraz dojdzie do krzyżowego połączenia (ang. *cross-linking*) ILT2 z TCR limfocyty to fosfataza SHP-1 defosforyluje znajdujące się w sąsiedztwie motywy ITAM kompleksu CD3 i/lub zasocjowane z nimi białka co inaktywuje kinazę ZAP70 i przerywa dalszą aktywację komórki [32]. Krzyżowe połączenie należy tu rozumieć jako przestrzenne zbliżenie się do siebie obu receptorów, które jest niezbędne do przeprowadzenia defosforylacji przez SHP-1 (Ryc. 5).

Wydaje się, wbrew wcześniejszym przypuszczeniom [32], że aktywacja ILT2 (jego fosforylacja) w limfocytach T nie wymaga wprawdzie jego interakcji z TCR/CD3. Potwierdzają to doświadczenia, w których inkubowano komórki RBL nie mające TCR/CD3, lecz posiadające transfekowany receptor ILT2, z komórkami linii 721.221 prezentującymi na swojej powierzchni cząsteczki HLA-B2705. Połączenie ligandu z receptorem wystarczało do fosforylacji motywów ITIM oraz uruchomienia fosfatazy SHP-1 [17]. A zatem to nie połączenie ILT2 z TCR jest odpowiedzialne za fosforylację motywów ITIM, lecz prowadzi do niej już samo związanie ligandu przez ILT2.

Hamujące działanie receptora ILT2 wobec innego niż TCR receptora aktywującego potwierdzono doświadczeniem przeprowadzonym na komórkach RBL, które wcześniej transfekowano cDNA dla ILT2. Na powierzchni tych komórek konstytutywnej

świadczeniu wydzielanie serotoniny także zapoczątkowane aktywacją FcεRI było hamowane przez receptory ILT4 i ILT5 [22]. Okazało się, że ILT2 hamuje także wewnątrzkomórkową mobilizację jonów wapniowych zapoczątkowaną przez im-

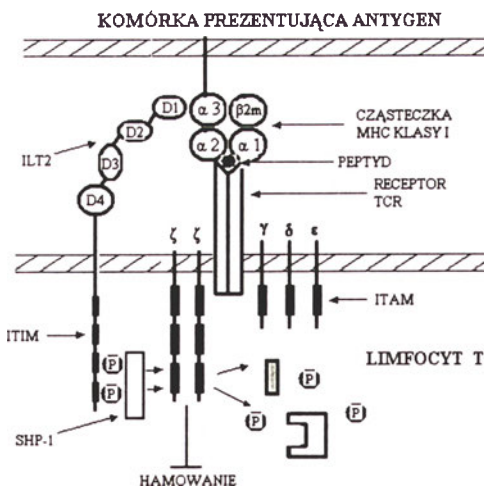


Ryc. 4. Wczesny etap przekazania sygnału aktywacji z TCR/CD3 do wnętrza limfocyty.

ekspresji ulegał receptor dla IgE (FcεRI). Transfekowane komórki uwalniały serotoninę kiedy były stymulowane przez opłaszczoną na płytce mysiej IgE (aktywacja komórki). Sekrecja serotoniny była wyraźnie hamowana w wyniku wprowadzenia do środowiska reakcji przeciwciał anti-ILT2 przymocowanych do dna plastikowego naczynka. Przeciwciała te

munoglobulinowy receptor limfocytów B [26], natomiast ILT4 hamuje uwalnianie jonów Ca^{2+} w komórkach dendrytycznych zapoczątkowane przez FcγRII [22].

Ciekawe okazały się także wyniki badań, w których sprawdzano, czy ILT2 w interakcji z cząsteczkami MHC klasy I hamuje zależną od superantygeny



Ryc. 5. Mechanizm hamowania aktywacji limfocyty T przez receptor ILT2.

w zastępstwie cząsteczek MHC I pełniły rolę „sztucznego” ligandu dla ILT2. Krzyżowe połączenie FcεRI z ILT2 wskutek wspólnego działania przeciwciał IgE i anti-ILT2 skutecznie hamowało aktywację komórek [24]. Analogicznie w innym do-

cytotoksyczność limfocytów T. Doświadczenia prowadzono na wyselekcjonowanych komórkach T $CD8^{+}$, które wiązały na swojej powierzchni przeciwciała anti-ILT2 (posiadały receptor ILT2) oraz posiadały receptor TCR z łańcuchem β efektywnie

wiazącym superantygen TSST-1 (ang. *toxic shock syndrome toxin-1*). Co więcej, aby wyeliminować wpływ innych receptorów hamujących, do doświadczeń wybrano te limfocyty, które dodatkowo nie posiadały receptorów KIR. Cytotoksyczność komórek T testowano na ludzkiej limfoblastycznej linii komórek B (721.221), pozbawionych możliwości syntezy cząsteczek MHC I, oraz na transfektantach tej samej linii wytwarzających HLA-B2705. Na obu rodzajach komórek ekspresji ulegały cząsteczki MHC klasy II wiążące superantygen. Okazało się, że limfocyty T skutecznie zabijają komórki B opłaszczone TSST-1, natomiast nie reagują na opłaszczony superantygenem transfektanty HLA-B2705. Cytotoksyczność w stosunku do tych komórek była częściowo przywracana w obecności fragmentów F(ab')₂ przeciwciał anty-ILT2. A zatem połączenie receptora ILT2 limfocytu T z cząsteczką HLA-B2705 obecną na transfektowanych komórkach linii 721.221 hamowało cytotoksyczność limfocytów T [26].

Także w przypadku ILT3, który ulega ekspresji na komórkach prezentujących antygen wykazano, że zachowuje się on jak receptor hamujący po krzyżowym połączeniu z receptorem aktywującym. Makrofagowy ILT3 w wyniku interakcji z FcγRIII hamował wewnątrzkomórkowe uwalnianie jonów wapniowych [33].

X. Domniemana fizjologiczna funkcja niektórych cząsteczek ILT

Fizjologiczna funkcja receptora ILT1 występującego na komórkach linii mieloidalnej nie została jak dotąd w pełni zdefiniowana. Przypuszcza się, że może on kontrolować produkcję niektórych cytokin (IL1, IL12 czy TNF-α) lub ekspresję cząsteczek kostymulujących. Ligand dla ILT1 nie jest znany. Wstępne badania z rozpuszczalnymi tetramerami cząsteczek MHC klasy I nie wykazały, aby mogły one pełnić rolę ligandów. Przypuszcza się, że mogą nimi być cząsteczki spokrewnione z MHC I takie jak CD1, MR1 czy MIC [30].

Niewiele także wiadomo o fizjologicznej funkcji ILT2. Doświadczenia prowadzone na limfocytach T sugerują, że receptor ten może podnosić próg ich aktywacji, co może zabezpieczać komórki przed reaktywnością w stosunku do własnych antygenów. W rezultacie jedynie kompleksy MHC-peptyd o dużym powinowactwie są zdolne wywołać odpowiedź immunologiczną. Hamowanie reaktywności skierowanej przeciw własnym antygenom przez receptory hamujące jest szczególnie ważne w przypadku komórek CD8 efektorowych i komórek T pamięci, które

nabywają w wyniku kontaktu ze swoistym antygenem niższy próg aktywacji w porównaniu z dziewiczymi komórkami T. Większość komórek T, na których powierzchni występuje ILT2 to rzeczywiście komórki CD8 efektorowe i komórki T pamięci.

Inną funkcją ILT2 a także innych hamujących receptorów ILT może być terminacja odpowiedzi immunologicznej. Po stymulacji limfocytów T, ich receptory TCR ulegają internalizacji a następnie degradacji w lizosomach. Zmniejszająca się liczba TCR na powierzchni w trakcie aktywacji komórki może zmieniać równowagę pomiędzy hamowaniem a aktywacją faworyzując receptory hamujące, co może w konsekwencji zahamować odpowiedź immunologiczną [32].

W przypadku komórek B receptor ILT2 może także wpływać na próg ich aktywacji warunkując tym samym, że jedynie swoiste antygeny są w stanie aktywować te komórki. ILT2 jest obecny na prawie wszystkich komórkach B krwi obwodowej. Natomiast jego ekspresja jest bardzo słaba lub wręcz niewykrywalna na komórkach B występujących w migdałkach. Sugeruje to, że ILT2 może ulegać ekspresji jedynie przed stymulacją antygenową, natomiast w pobudzonych limfocytach B jego ekspresja może zanikać.

W komórkach linii mieloidalnej ILT2 może natomiast modulować odpowiedź zapalną związaną z zakażeniami bakteryjnymi regulując produkcję cytokin i zabezpieczając normalne tkanki przed zniszczeniem [26].

Pomimo iż ligand dla ILT3 nie został dokładnie poznany, udowodniono że ILT3 po związaniu ligandu ulega wraz z nim internalizacji. W endosomach ligand jest uwalniany, a po degradacji trafia na powierzchnię w postaci peptydów w kompleksie z cząsteczkami MHC II. Odkrycie to sugeruje zaangażowanie ILT3 w wyłapywanie antygenów i ich prezentację [33]. Wydaje się, że za internalizację ILT3 mogą odpowiadać motywy ITIM, których sekwencja pokrywa się z konsensusem Tyr-X-X-reszta hydrofobowa. Motywy tego typu występują w wielu białkach odnajdywanych w przedziałach endocytarnych, o których wiadomo, że pośredniczą w internalizacji innych białek z powierzchni komórki [10]. Ekspresja ILT3 jest szczególnie wysoka w komórkach dendrytycznych, których główną funkcją jest pochłanianie antygenów i ich prezentacja limfocytom T. Do tej pory opisano kilka różnych receptorów zaangażowanych w pochłanianie antygenów przez komórki dendrytyczne. Jak się wydaje jednym z nich może być ILT3 [33].

Także w przypadku ILT4 można jedynie domyślać się jego funkcji. Wydaje się, że receptor ten może kontrolować monocytarno-makrofagową odpowiedź zapalną hamując aktywność tych komórek [22].

Ekspresja cząsteczek ILT, z których jedne stymulują, a inne hamują aktywację komórek, może więc w znaczący sposób wpływać na układ odpornościowy zmieniając delikatną równowagę pomiędzy pobudzaniem a hamowaniem odpowiedzi immunologicznej [3].

Podziękowania

Dziękuję Panu doc. dr hab. Piotrowi Kuśnierzcykowi oraz Pani dr Marii Mańczak za ich cenne uwagi, które pomogły mi w napisaniu tej pracy.

Artykuł otrzymano 1 lipca 2002

Zaakceptowano do druku 8 maja 2003

Piśmiennictwo

1. Torkar M, Haude A, Milne S, Beck S, Trowsdale J, Wilson MJ (2000) *Eur J Immunol* **30**: 3655-3662
2. Liu WR, Kim J, Nwankwo C, Ashworth LK, Arm JP (2000) *Immunogenetics* **51**: 659-669
3. Borges L, Hsu M-L, Fanger N, Kubin M, Cosman D (1997) *J Immunol* **159**: 5192-5196
4. Allen RL, Raine T, Haude A, Trowsdale J, Wilson M J (2001) *J Immunol* **167**: 5543-5547
5. Wagtmann N, Rojo S, Eichler E, Mohrenweiser H, Long EO (1997) *Curr Biol* **7**: 615-618
6. Saverino D, Fabbì M, Ghiotto F, Merlo A, Bruno S, Zarcone D, Tenca C, Tiso M, Santoro G, Anastasi G, Cosman D, Grossi CE, Ciccone E (2000) *J Immunol* **165**: 3742-3755
7. Banham AH, Colonna M, Cella M, Micklem KJ, Pulford K, Willis AC, Mason DY (1999) *J Leukocyte Biol* **65**(6): 841-845
8. Fanger NA, Cosman D, Peterson L, Braddy SC, Maliszewski CR and Borges L (1998) *Eur J Immunol* **28**: 3423-3434
9. Torkar M, Norgate Z, Colonna M, Trowsdale J, Wilson MJ (1998) *Eur J Immunol* **28**: 3959-3967
10. Samaridis J and Colonna M (1997) *Eur J Immunol* **27**: 660-665
11. Wende H, Volz A, Ziegler A (2000) *Immunogenetics* **51**: 703-713
12. Volz A, Wende H, Laun K, Ziegler A (2001) *Immunol Rev* Vol. **181**: 39-51
13. Trowsdale J, Barten R, Haude A, Stewart CA, Beck S, Wilson M (2001) *Immunol Rev* **181**: 20-38
14. Young NT, Canavez F, Uhrberg M, Shum BP, Parham P (2001) *Immunogenetics* **53**: 270-278
15. Brown TA (2001) *Genomy* Wydawnictwo Naukowe PWN
16. Arm JP, Nwankwo C, Austen KF (1997) *J Immunol* **159**: 2342-2349
17. Bellon T, Kitzig F, Sayos J, Lopez-Botet M (2002) *J Immunol* **168**: 3351-3359
18. Martin AM, Kulski JK, Witt C, Christiansen FT (2002) *Trends Immunol* Vol. **23** No. 2: 81-88
19. Morton HC, Egmond M, Winkel JGJ (1996) *Crit Rev Immunol* **16**: 423-440
20. Sawicki MW, Dimasi N, Natarajan K, Wang J, Margulies DH, Mariuzza RA (2001) *Immunol Rev* Vol. **181**: 52-65
21. Jakóbsiak M (2000) *Immunologia* Wydawnictwo Naukowe PWN
22. Colonna M, Samaridis J, Cella M, Angman L, Allen RL, Callaghan CA, Dunbar R (1998) *J Immunol* **160**: 3096-3100
23. Cosman D, Fanger N, Borges L, Kubin M, Chin W, Peterson L, Hsu M-L (1997) *Immunity*, Vol. **7**: 273-282
24. Chapman TL, Heikema AP, West AP, Jr, Bjorkman PJ (2000) *Immunity* Vol. **13** (Nov.): 727-736
25. Lopez-Botet M, Llano M, Ortega M (2001) *Immunol Rev* Vol. **181**: 193-202
26. Colonna M, Navarro F, Bellon T, Llano M, Garcia P, Samaridis J, Angman L, Cella M, Lopez-Botet M (1997) *J Exp Med* Vol. **186**, No.11: 1809-1818
27. Navarro F, Llano M, Bellon T, Colonna M, Geraghty DE, Lopez-Botet M (1999) *Eur J Immunol* **29**: 277-283
28. Kenneth LR, Gamble S, Rothstein L, Gramm C, Baruj B (1991) *Cell* Vol. **65**: 611-620
29. Rachel LA, O'Callaghan CA, McMichael AJ, Bowness P (1999) *J Immunol* **162**: 5045-5048
30. Nakajima H, Samaridis J, Angman L, Colonna M (1999) *J Immunol* **162**: 5-8
31. Egmond M, Damen CA, Spriel AB, Vidarsson G, Garderen E, Winkel JGJ (2001) *Trends Immunol* Vol. **22** No. 4: 205-211
32. Dietrich J, Cella M, Colonna M (2001) *J Immunol* **166**: 2514-2521
33. Cella M, Dohring C, Samaridis J, Dessing M, Brockhaus M, Lanzavecchia A, Colonna M (1997) *J Exp Med* Vol. **185**, No. 10: 1743-1751

Dolichole, długłańcuchowe lipidy izoprenoidowe biorące udział w modyfikacjach białek

Dolichols, long-chain isoprenoid lipids required for protein modification

GRAŻYNA SOSIŃSKA

Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Lipidy izoprenoidowe — budowa w drożdżach, grzybach nitkowatych i bakteriach
- III. *cis*-Prenyltransferaza
- IV. Biosynteza fosforanu dolicholu
 - IV-1. Biosynteza difosforanu α -poliprenolu
 - IV-2. Defosforylacja, saturacja i refosforylacja produktów *cis*-PT w drożdżach
- V. Funkcja fosforanu dolicholu w modyfikacji białka
 - V-1. Funkcja w *N*-glikozylacji
 - V-2. Funkcja w *O*-mannozylacji
 - V-3. Funkcja w syntezie GPI
- VI. Podsumowanie

Contents:

- I. Introduction
- II. Isoprenoid lipids in yeast, filamentous fungi and bacteria; occurrence and structure
- III. *cis*-Prenyltransferase
- IV. Biosynthesis of dolichyl phosphate
 - IV-1. Biosynthesis of α -poliprenyl diphosphate
 - IV-2. Dephosphorylation, saturation and rephosphorylation of *cis*-PT products in yeast
- V. Function of dolichyl phosphate in protein modification
 - V-1. Function in *N*-glycosylation
 - V-2. Function in *O*-mannosylation
 - V-3. Function in GPI biosynthesis
- VI. Conclusion

Wykaz stosowanych skrótów: ALG (ang. *Asparagine Linked Glycosylation*) — Alg7- UDP-GlcNAc transferaza, Alg1 — β -1,4 mannozylotransferaza, Alg2 — α -1,3-, α -1,6 mannozylotransferaza, Alg3 — α -1,3 mannozylotransferaza, Alg9 — α -1,2 mannozylotransferaza, Alg12 — α -1,6 mannozylotransferaza, Alg6 — α -1,3 glukozyltransferaza, Alg8 — α -1,3 glukozyltransferaza, Alg10 — α -1,2 glukozyltransferaza; Asn — asparagina; CHO — linia komórek ssaczy (ang. *Chinese Hamster Ovary*); *cis*-PT — *cis*-prenyltransferaza; DDDD — motyw oznaczający sekwencję bogatą w asparaginę; DMAPP — difosforan dimetyloallilu; Dol-P — fosforan dolicholu; Dol-PGlc — dolichylofosfoglucoza; Dol-Pman — dolichylofosfomannoza; Dol-P-PglcNAc — dolichylo-difosfo-*N*-acetyloglucozamina; DOXP — 1-deoksy-D-ksylulozo-5-fosforan; Dpm1 — syntaza dolichylofosfomannozy; ER — retikulum endoplazmatyczne; Erg8 — kinaza mewanionu; Erg10 — tiolaza acetyloacetylo-CoA; Erg12 — kinaza 5-fosfomewanionu; Erg13 — syntaza 3-hydroksy-3-metyloglutarylo-CoA; Erg19 — dekarboksylaza 5-difosfomewanionu; Erg20 — syntaza difosforanu farnesylu; Etn — etanoloamina; FPP — difosforan farnesylu; Gas1 — β -1,3-glukozyltransferaza; GDP-Man — GDP-mannoza; GlcNAc — *N*-acetyloglucozamina; GlcN-acylPI — *N*-acetyloglucozofosfatydyloinozytol; GlcN-PI — *N*-glukozylo-

fosfatydyloinozytol; GPI — kotwica glikozylfosfatydyloinozytolu; Gpi10 — białko katalizujące dołączenie trzeciej reszty mannozy do prekursora kotwicy glikozylfosfatydyloinozytolu; GPI-MT-I — białko katalizujące dołączenie pierwszej reszty mannozy do prekursora kotwicy glikozylfosfatydyloinozytolu; GPI-MT III — białko katalizujące dołączenie trzeciej reszty mannozy do prekursora kotwicy glikozylfosfatydyloinozytolu; GPP — difosforan geranylu; Hmg1p, Hmg2p — reduktaza 3-hydroksy-3-metyloglutarylo-CoA; Idi1 — izomeraza difosforanu izopentenylu; IPP — difosforan izopentenylu; Krel2 — białka zaangażowane w syntezę β -glukanu; MEP — 2-C-metylo-D-erytro-4-fosforan; OS — łańcuch oligosacharydowy; Ost1p, Ost5p, Swp1p, Swb1p, Ost2p, Stt3p, Ost4p, Ost3p, Ost6p — podjednostki kompleksu OST (ang. *oligosaccharyltransferase*); P-GlcNAc — fosforan *N*-acetyloglucozamin; PI — fosfatydyloinozytol; Pig-B — białko katalizujące dołączenie trzeciej reszty mannozy do prekursora kotwicy glikozylfosfatydyloinozytolu; PIG-M — białko katalizujące przeniesienie pierwszej reszty mannozy do prekursora kotwicy glikozylfosfatydyloinozytolu; PI-PLC — fosfolipaza C; Pkc1 — kinaza białkowa C; PMT — *O*-mannozyltransferaza (ang. *protein O-mannosyltransferase*); Rer2 — *cis*-prenyltransferaza w *S. cerevisiae*; Rft1 — flipaza przenosząca łańcuch cukrowy: Man₅GlcNAc₂-PP-Dol do światła retikulum endoplazmatycznego; Sec59 — kinaza dolicholu; Srt1 — *cis*-prenyltransferaza w *S. cerevisiae*; UDP-GlcNAc — UDP-*N*-acetyloglucozamina.

Mgr inż., Laboratorium Glikobiologii Grzybów, Instytut Biofizyki i Biochemii PAN, ul. Pawińskiego 5a, 02-106 Warszawa, e-mail: grazynas@ibb.waw.pl

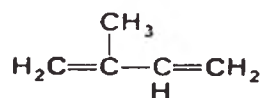
I. Wstęp

Długołańcuchowe lipidy izoprenoidowe (dolichole i poliprenole) biorące udział w kotranslacyjnym przyłączaniu reszt cukrowych do białek, są zlokalizowane w błonach endoplazmatycznego retikulum (ER). Podstawowym elementem ich budowy jest pięciowęglowa reszta izoprenowa. Mogą występować w formie wolnych alkoholi oraz estrów kwasów tłuszczowych lub fosforanów łatwo ulegających hydrolizie. Występujące w komórkach eukariotycznych stanowią mniej niż 1% fosfolipidów błon komórkowych, mimo to są ich istotnym składnikiem. Dolichole jako związki wielonienasycone zmieniają półpłynną strukturę błon komórkowych a połączenia estrowe dolicholi i kwasów tłuszczowych stanowią o jej zróżnicowanej budowie [1]. Lipidy izoprenoidowe: sterole, dolichole, poliprenole a także łańcuch boczny ubiquinonu są syntetyzowane w szlaku kwasu mewalonowego. Liczbę związków które powstają z udziałem reakcji zachodzących w szlaku mewalonowym określa się na ponad 23000. Wspólnym substratem do syntezy większości z nich jest difosforan farnezyli (FPP) — produkt reakcji katalizowanej przez białko Erg20 [2, 3]. Pierwszym enzymem wykorzystującym FPP jako cząstkę starterową w odgałęzieniu prowadzącym do syntezy dolicholi, jest *cis*-prenylotransferaza (*cis*-PT) katalizująca syntezę szkieletu węglowodorowego dolicholi. *N*-glikozylacja jest jednym z podstawowych procesów modyfikacji białek w komórkach eukariotycznych podczas którego jest budowany i kowalencyjnie wiązany z białkiem łańcuch oligosacharydowy. Ufosforylowane formy dolicholi (Dol-P) pełnią funkcje nośnika na którym przez dołączanie monomerycznych cukrów formowany jest pełnej długości łańcuch cukrowy o budowie: GlcNAc₂ Man₉Glc₃ będący donorem łańcucha oligosacharydowego w procesie syntezy

co wynika z niezmiennego w trakcie ewolucji sposobu jego biosyntezy. Dolichole są także nośnikiem reszt cukrowych w *O*-mannozylacji oraz syntezie kotwicy glikozylofosfatydyloinozytolu (GPI). Odpowiedniki dolicholi — undekaprenole jako przenośniki monocukrów pełnią istotną funkcję w modyfikacji składników ściany komórek bakterii: O-antygeny, peptydoglikanu, kwasu teichowego [5].

II. Lipidy izoprenoidowe — budowa w drożdżach, grzybach nitkowatych i bakteriach

Nazwa izoprenoli wywodzi się od podstawowej jednostki budującej te związki — izoprenu (Ryc.1).



Ryc. 1. Wzór strukturalny izoprenu [6].

Prócz dolicholi, w których jednostka izoprenowa α podlega saturacji, występują formy zawierające nienasycone wiązanie α -izoprenowe, są to poliprenole. Przykładem mogą być undekaprenole zawierające jedenaście reszt izoprenu, występujące u bakterii oraz liczne poliprenole występujące u roślin [7]. Dolichole grzybów z rodzaju *Aspergillus* wykazują odmienną budowę od form występujących u drożdży i bakterii. Analiza rodziny dolicholi gatunku *A. niger* wykazała występowanie trzech jednostek izoprenowych nasyconych: α , ψ , ω oraz dodatkowej grupy egzometylenowej przy jednostce izoprenowej ω [8].

Ilość jednostek izoprenowych wchodzących w skład poliprenoli jest gatunkowo specyficzna (Tab. 1).

W komórkach *Eukaryota* a także *Mycobacteriae* mamy do czynienia z rodziną izoprenoli, w której do-

Tabela 1

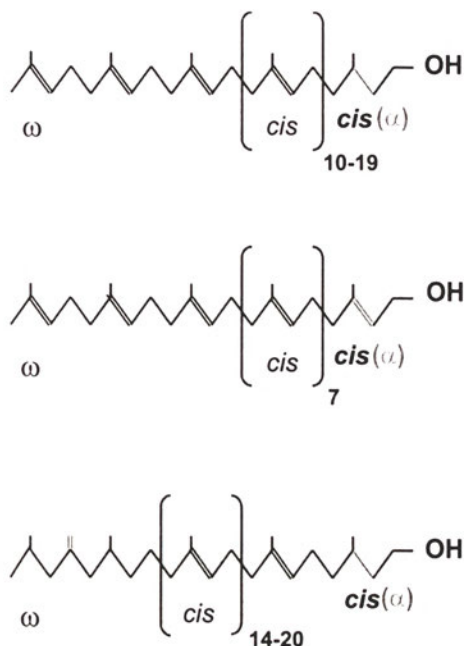
Długość łańcuchów węglowodorowych dolicholi i poliprenoli [11-13]

Organizm	Ilość jednostek izoprenowych
<i>Archea</i>	11 (C55)
<i>Mycobacteriae</i>	7-10 (C 35-50)
<i>Eubakteriae</i>	11 (C55)
<i>Trypanosoma brucei</i>	11-12(C55-60)
<i>Drosophila melanogaster</i>	16-17(C80-C85)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	14-18(C 70-90)
	18-23 (C90-115)
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	17 (C85)
ssaki	19-21 (C95- 105)
rośliny	8-40(C40- 200)

wiązania *N*-glikozydowego [4]. Budowa jego części rdzeniowej jest wspólna dla różnych glikoproteidów

minuje jedna lub kilka charakterystycznych długości łańcucha. Przykładem mogą być komórki drożdży

S. cerevisiae, w których synteza dolicholi jest zależna od aktywności dwóch białek: Rer2 i Srt1. Produkty *cis*-PT zależnej od białka Rer2 są zbudowane z 14-18 jednostek izoprenowych, natomiast produkty białka Srt1 są dłuższe i zawierają 18-23 jednostek izoprenowych (Ryc. 2). W komórkach drożdży prze-



Ryc. 2. Struktura izoprenoli w komórkach: A. *S. cerevisiae* [10], B. *E. coli* [9], C. *A. niger* [8].

ważają formy krótsze będące produktami białka Rer2, natomiast produkty Srt1 nie są wykrywalne w logarytmicznej fazie wzrostu drożdży. Niska zawartość produktów białka Srt1 może wynikać z kompetycji o substrat — difosforan farnezyli (FPP) lub difosforan geranyli (GPP) (porównaj poniżej), która zachodzi między dwoma *cis*-PT. Przy zwiększonym poziomie substratu obserwowano bowiem pojawienie się nietypowej dla szczepu dzikiego puli poliprenoli zbudowanych z 27 jednostek izoprenowych [14]. Ssacze komórki np.CHO (ang. *Chinese hamster ovary*) zawierają dolichole o długości C85-C100 z dominującą długością C95, natomiast u grzybów nitkowatych *A. niger* długość dolicholi wynosi od 18 do 24 jednostek izoprenowych z przewagą dolicholi o 21 jednostkach izoprenowych (Tab. 2).

III. *cis*-Prenylotransferaza

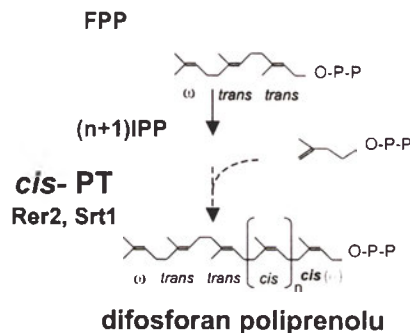
cis-PT (EC:2.5.1.31) jest pierwszym enzymem dolicholowego odgałęzienia szlaku kwasu mewalowego. *cis*-PT jest (Z)-prenylotransferazą zależną od Mg^{2+} katalizującą wydłużanie łańcucha poliprenolowego dehidropoliprenoli przez dołączanie cząstek difosforanu izopentenylu (IPP) w konfigura-

Tabela 2

Skład rodziny dolicholi w *A. niger* [8]

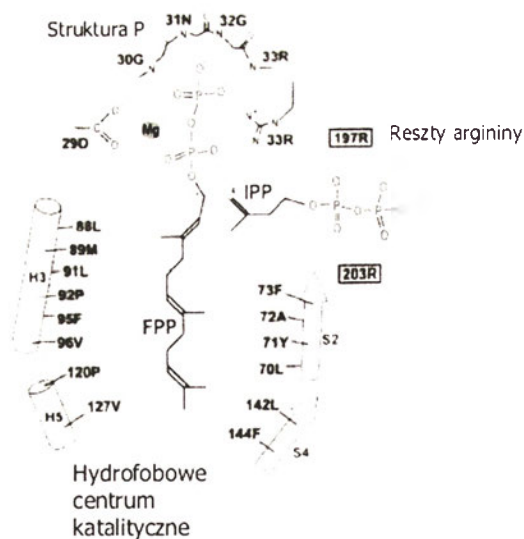
Długość dolicholi (jednostki izoprenowe)	Zawartość
18	1%
19	12%
20	29%
21	37%
22	15%
23	6%
24	1%

cji *cis* do ditrans difosforanu farnezyli (FPP) [15] (Ryc. 3). Ponadto *cis*-PT może wykorzystywać jako



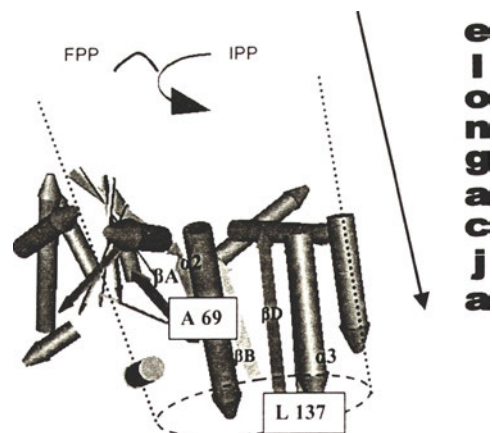
Ryc. 3. Reakcja wydłużania łańcucha węglowodorowego poliprenoli [15].

cząstkę starterową, choć z mniejszą wydajnością, difosforan geranyli (GPP) lub difosforan citronellyli [16]. Skrystalizowanie *cis*-PT z *Micrococcus luteus* pozwoliło stwierdzić, że o strukturze trzeciorzędowej enzymu decyduje motyw bogaty w asparaginę (DDDD) [17]. Zgodnie z tym modelem miejsce katalityczne wyznacza hydrofobowe centrum aktywne. Jego pojemność umożliwia akumulację hydrofobowego szkieletu węglowego produktu reakcji. Centrum katalityczne wiąże szkielet węglowy FPP, wiązanie to jest stabilizowane w wyniku oddziaływania grupy fosforanowej FPP z dodatnim ładunkiem trzydziestej reszty glicyny, trzydziestej pierwszej reszty asparaginy, trzydziestej drugiej reszty glicyny oraz trzydziestej trzeciej reszty argininy tworzących tzw. pętlę P znajdującą się u wejścia do centrum aktywnego oraz przez utworzenie wiązań między jonami magnezu a negatywnym ładunkiem grupy fosforanowej FPP. IPP może być wiązane przez oddziaływanie z pozytywnymi ładunkami 197 i 203 reszty argininy (Ryc. 4). Mechanizm terminacji wydłużania łańcucha węglowego poliprenoli, będący przyczyną zmiennej długości produktów reakcji katalizowanych przez *cis*-PT z różnych organizmów dotychczas nie jest poznany. Przypuszcza się, że przyczyną zmiennej długości izoprenoli u różnych gatunków może być pojemność hydrofobowego cen-



Ryc. 4. Model centrum katalitycznego *cis*-PT *M. luteus* [17].

trum aktywnego, w którym akumulowany jest produkt. Według modelu proponowanego dla *cis*-PT z *E. coli* [18] centrum aktywne wyznacza motyw złożony z dwóch struktur α i czterech struktur β , tworzących tunel, w którym wiązane są substraty i jest akumulowany produkt reakcji (Ryc. 5). Przy pomocy ukierunkowanej mutagenезy pokazano, że zamiana aminokwasu o dużym łańcuchu bocznym na mniejszy podstawnik prowadzi do syntezy dłuższych produktów nietypowych dla aktywności *cis*-PT. Zamiana leucyny 137 na alaninę zwiększa pojemność centrum, tym samym umożliwia syntezę dłuższych produktów (C70) zamiast C55. Porównanie sekwencji *cis*-PT drożdży *S. cerevisiae*, która katalizuje syntezę dolicholi zbudowanych z 14-16 reszt izopreno-



Ryc. 5. Model przestrzenny *cis*-PT *E. coli* [18]. Hydrofobowe centrum katalityczne, zaznaczono aminokwasy mające wpływ na formowanie produktu.

wych z sekwencją *cis*-PT *E. coli* wskazuje, że w miejscu odpowiadającym leucynie 137 *E. coli* występuje alanina 154 co potwierdza przypuszczenie, że wielkość łańcucha bocznego aminokwasu może być jednym z czynników mających wpływ na długość syntetyzowanego produktu. Dodatkowo zamiana alaniny 69 na leucynę powodowała akumulację produktu o 30 atomach węgla, co sugeruje, że mniejszy łańcuch boczny alaniny ma znaczenie dla wydłużania produktu do długości C55 (Ryc. 6).

Stopień homologii między sekwencjami białek Rer2 i Srt1 wynosi około 30%. Niezależnie od podobieństw strukturalnych białka Rer2 i Srt1 podlegają odmiennemu mechanizmowi regulacji a także są zlokalizowane w innych przedziałach komórkowych. Białko Rer2 zasocjowane jest z ER. Rer2 odpowiada za główną aktywność *cis*-PT a kodujący go gen ulega ekspresji konstytutywnej. Białko Srt1 zlokalizowane jest w ciałach lipidowych, jego ekspresja ulega in-

<i>E. coli</i>	1	-----mallsatqpl-seklpahgc-----rhvaidmggrwakkqgkikafghkagaksvravsfasungriealtl
<i>M. luteus</i>	1	afpikkr-----kaiknnnin-aaqip-----khiaimdggrwakkqkkiprighyegmqtkkityasdigkyitl
<i>S. cerevisiae</i> Rer2	1	metdsqpgphsfvkwtknifsrclkaencvp-----rhvgfmdgmrirfarkkemdvgkheagfvsurilelcyagvdatv
<i>S. cerevisiae</i> Srt1	1	mkapsiiq-----iqfvalkrl-lveckeqmcfavksifqrufavvmsisfsufymnlmikalirvgvpvpehvsfildgmriryaksrlipokkgheaggltltilyickrlgvkcvsa
<i>E. coli</i>	68	yafssenuwpqavevsmelf---vvaldsevkshrhnn---vlriigdtstfnslqerirksealtagmtgltlniaanygrrudivqgvrqlaekvqqnlpqddideealnq
<i>M. luteus</i>	71	yafstenuwrpkdevmlyaklp---ydfintfipeliakn---vkvetigfiddipdhkkavleakckthntgltlvalnyggkkelisavqlaeryksgelsideisethfne
<i>S. cerevisiae</i> Rer2	62	rafsientkssreveslmltlarerirqrtergelackyg---vnrkiigdisilskiledvrsvatcknnkratlnicfpytgreeilhamketivqhkkg---aaidestles
<i>S. cerevisiae</i> Srt1	117	yafsientnrpkveevdclmnlf---cvkldefakrakdykdplygskrirvgdqslspzarkkkkveeetqdgddftlfcfpytsrndahtirdsvedhle-nksprnirkfctnk
<i>E. coli</i>	180	hvcmhelapvdvrtvggehrisnflwqi-ay--aelyftdvlpdff-----eqdfegal-----nafanterr---fggtep-----gdet
<i>M. luteus</i>	183	yifstanwpdpellirtsgeerlsnflwqc-sy--sefvfidefwpdff-----eeslaqci-----siyqnthr---fggl-----
<i>S. cerevisiae</i> Rer2	193	hlytagvppidliirtsgvrsldflwqa-sskgvriellldclwpfeg-----pinaavllkfsthksflnkeryr---leegdy-----deet
<i>S. cerevisiae</i> Srt1	233	nymgfhsnkceliirtsghrisrdymilqvhen--atiefsdclwpnfaffamylalikusffstiqkyneknhsifekihesvp-----sifkktktamslyntpppisvsvtgde-
<i>E. coli</i>	253	a-----
<i>M. luteus</i>	250	-----
<i>S. cerevisiae</i> Rer2	274	ngdpidlkekkin
<i>S. cerevisiae</i> Srt1	344	-----

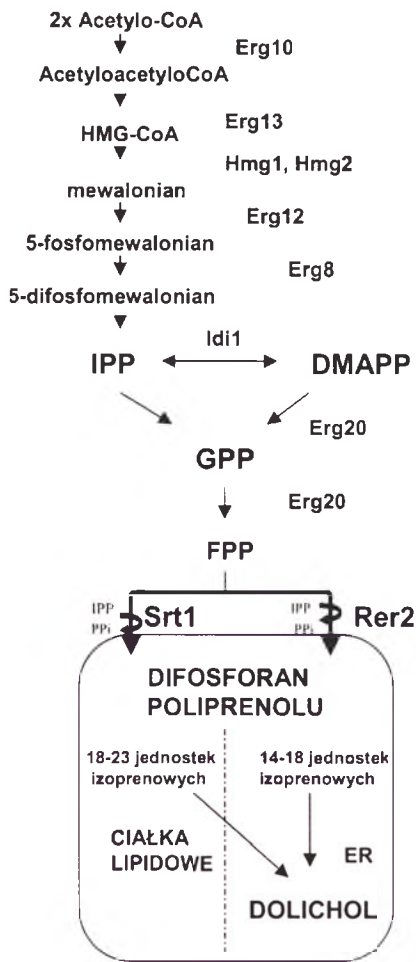
Ryc. 6. Porównanie sekwencji aminokwasów (Z)-prenylotransferaz z: *E. coli* (Swiss Prot Q47675), *M. luteus* (Swiss Prot 082827), *S. cerevisiae*: Rer2 (Swiss Prot P35196), *S. cerevisiae* Srt1 (Swiss Prot Q03175). Szarym kolorem zaznaczono sekwencje homologiczne, strzałka wskazuje aminokwasy mogące mieć wpływ na długość produktu: leucyna 137 *E. coli* odpowiada alaninie 154 w białku Rer2 *S. cerevisiae*.

dukcji po przejściu drożdży do stacjonarnej fazy wzrostu. Do indukcji *SRT1* dochodzi również w warunkach unieczynnienia genu *RER2*, kiedy białko Srt1 przejmuje funkcję głównej *cis*-PT [19].

IV. Biosynteza fosforanu dolicholu

IV-1. Biosynteza difosforanu α-poliprenolu

Podstawowe składniki z których zbudowany jest szkielet dolicholi i poliprenoli: difosforan farnezylu (FPP) i difosforan izopentenylu (IPP) powstają w szlaku kwasu mewalonowego, w wyniku przekształceń acetyloCoA (Ryc. 7). Szlak ten jest dobrze



Ryc. 7. Biosynteza dolicholi a szlak kwasu mewalonowego.

scharakteryzowany w komórkach drożdży *S. cerevisiae*. W wyniku kondensacji dwóch cząstek acetylo-CoA, katalizowanej przez tiolazę acetyloacetylo-CoA (białko Erg10), powstaje acetyloacetylo-CoA [20-21]. Związek ten jest substratem dla syntazy 3-hydroksy-3-metyloglutarylo-CoA (białka Erg13) [22]. Redukcja 3-hydroksy-3-metyloglutarylo-CoA, katalizowana w komórkach drożdży przez dwa białka: Hmg1p, Hmg2p [23], prowadzi do powstania

kwasu mewalonowego. Kinazy Erg12p i Erg8p katalizują fosforylację mewalonianu do 5-difosfomewalonianu [24-25]. W wyniku jego dekarboksylacji katalizowanej przez białko Erg19, 5-pirofosfomewalonian jest przekształcany w pięciowęglowy związek — difosforan izopentenylu (IPP) [26-27]. Enzymy zaangażowane w syntezę IPP w komórkach drożdży zlokalizowane są w cytosolu po cytoplazmatycznej stronie ER, wyjątek stanowi reduktaza HMG-CoA, która jest integralnym białkiem błonowym [28].

W plastydach roślin, alg, chryzofitów oraz u niektórych chorobotwórczych bakterii i pasożytów została zidentyfikowana alternatywna droga otrzymywania IPP [29]. W tym przypadku synteza IPP rozpoczyna się od reakcji pirogronianu z aldehydem 3-fosfoglicerynowym katalizowanej przez syntazę 1-deoksy-D-ksylulozo-5-fosforanu (syntazę DOXP). DOXP jest przekształcany przez reduktioizomerazę zależną od NADPH, produktem reakcji jest 2-C-metylo-D-erytro-4-fosforan (MEP). Kolejne reakcje katalizowane przez syntazę CDP-ME, CDP-ME kinazę, cyklodifosfo-ME syntazę, fosfatazy, reduktazy i dehydratazę prowadzą do otrzymania IPP.

IPP w kolejnych reakcjach jest przekształcany przez białko Idl1 katalizujące izomeryzację IPP do difosforanu dimetyloallilu (DMAPP) [30] oraz białko Erg20 (E)-prenylotransferazę katalizującą kondensację IPP i DMAPP w konfiguracji *trans* prowadzącą do powstania difosforanu geranylu (GPP). Białko Erg20 katalizuje również dołączenie kolejnej cząsteczki IPP do GPP [31-33] w wyniku czego powstaje związek piętnastowęglowy: pirofosforan farnezylu (FPP) zawierający trzy nienasycone wiązania, z których dwa wewnętrzne są w konfiguracji *trans*. FPP jest starterem, do którego przyłączane są kolejne cząstki IPP w konfiguracji *cis* w reakcji katalizowanej przez (Z)-prenylotransferazę (*cis*-PT) co prowadzi do syntezy difosforanów poliprenoli.

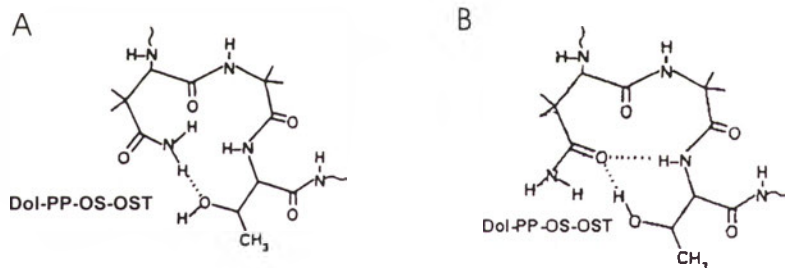
IV-2. Defosforylacja, saturacja i refosforylacja produktów *cis*-PT w drożdżach

Difosforany poliprenoli będące produktami reakcji katalizowanej przez *cis*-PT ulegają przekształceniom prowadzącym do syntezy dolicholi. Pierwszy etap reakcji polega na defosforylacji w wyniku czego powstaje alkohol poliprenolowy. Następnie jego reszta izoprenowa α ulega saturacji. Wprawdzie dotychczas nie zidentyfikowano białek biorących udział w tym procesie, jednakże uważa się, że saturacja ma związek z rozpoznaniem długości łańcucha dehydrodolicholu przez 50kDa białko, które oddziałuje z hydrofobową częścią dehydrodolicholu

uniemożliwiając jego dalszą elongację [34]. Związek długości poliprenolu z procesem saturacji może mieć funkcję regulatorową w syntezie dolicholi w komórkach drożdży. Część produktów białka Srt1 katalizującego syntezę dłuższych poliprenoli (C80-120) występuje w formie nienasyconej. Z drugiej strony fakt ten może mieć również związek z utrudnioną dystrybucją α -saturazy odpowiedzialnej za reakcję redukcji wiązań α do ciał lipidowych gdzie zlokalizowane jest białko Srt1.

Dolichol powstający w wyniku saturacji α -dehydrodolicholu, może ulec refosforylacji w wyniku działania CTP zależnej kinazy. Potwierdzają to badania z użyciem znakowanych [γ - ^{32}P] trifosfonukleotydów [35-36]. Uważa się, że w drożdżach *S. cerevisiae* w proces refosforylacji jest zaangażowane białko Sec59. Termowrażliwy mutant genu *SEC59* wykazuje obniżony poziom fosforanu dolicholu (Dol-P) do 48% w temperaturze permissyjnej i 10% w temperaturze restrykcyjnej w porównaniu ze szczepem dzikim, akumuluje niekompletnie glikozylowane białka w ER oraz wykazuje zaburzenia w syntezie Dol-PMann, *O*-mannozylacji i syntezie kotwicy fosfatydylinozytolu (GPI). Dodanie egzogennej Dol-P odwraca efekt mutacji *sec59* [37].

katalizowanej przez transferazę Alg7p. Do Dol-P-PGlcNAc dołączana jest kolejna cząsteczka GlcNAc z utworzeniem wiązania β -1,4-glikozydowego. Przeniesienie pięciu reszt mannozy z aktywnych donorów — cząstek GDP-Man z udziałem transferaz: Alg1p, Alg2p jest ostatnim etapem reakcji zachodzącym po zewnętrznej stronie ER. Uformowany na Dol-P łańcuch cukrowy przenoszony jest do światła ER przez flipazę — białko Rft1 [38]. Po wewnętrznej stronie ER za pośrednictwem transferaz: Alg3p, Alg9p, Alg12p, Alg6p, Alg8p, Alg10p do uformowanego na Dol-P łańcucha: GlcNAc₂Man₅ dołączane są kolejne cząstki mannozy i glukozy, których donorami są Dol-PMann i Dol-PGlc [39]. Uformowany łańcuch: GlcNAc₂Man₉Glc₃ jest kotranslacyjnie przenoszony na glikozylowane białko zawierające motyw: Asn-X-Ser/Thr rzadziej Asn-X-Cys, Asn-Gly-Gly-Thr, (X \neq Pro). Według hipotetycznych modeli sekwencje te umożliwiają przyjęcie przez białko struktury pętli, która tworzona jest przez oddziaływanie między β -amidowym azotem asparaginy a grupą hydroksylową seryny lub treoniny (Ryc. 8A) lub przez wiązania wodorowe między β -karbonylową grupą asparaginy a grupą hydroksylową i β -amidowym azotem treoniny lub seryny



Ryc. 8. Struktura białka umożliwiająca przyłączenie łańcucha oligosacharydowego.

V. Funkcja fosforanów dolicholi w modyfikacji białka

V-1. Funkcja w *N*-glikozylacji

N-glikozylacja jest modyfikacją polegającą na kotranslacyjnym przyłączeniu łańcucha cukrowego do białka. Łańcuch cukrowy jest syntetyzowany na nośniku lipidowym a następnie jest przenoszony na białko z utworzeniem wiązania *N*-glikozydowego między azotem asparaginy glikozylowanego białka a *N*-acetyloglukozoaminą. Po zewnętrznej (cytoplazmatycznej) stronie ER do reszty fosforanowej Dol-P dołączany jest pierwszy cukier — fosforan *N*-acetyloglukozoaminy (P-GlcNAc). Jest on przenoszony z aktywnej formy UDP-GlcNAc w reakcji

(Ryc. 8B). Struktura ta jest niezbędna do związania kompleksu oligosacharydotransferazy (OST) katalizującego przeniesienie łańcucha cukrowego z Dol-PPGlc₃Man₉NAc₂ na białko. Drożdżowy kompleks OST jest białkiem integralnym ER i składa się z dziewięciu podjednostek: Ost1p, Ost5p, Swp1p, Swbp1p, Ost2p, Stt3p, Ost4p, Ost3p, Ost6p tworzących trzy kompleksy [40].

V-2. Udział dolicholu w *O*-mannozylacji

Strukturę łańcucha cukrowego związanego z resztą seryny lub treoniny białka wiązaniem *O*-glikozydowym po raz pierwszy scharakteryzowali S e n t a n d r e u i N o r t h c o t e [41]. Związany *O*-glikozydowo łańcuch cukrowy jest nierozgałęziony i za-

późniejszych etapach syntezy GPI grupa acylowa ulega usunięciu, czyniąc ostateczną formę GPI wrażliwą na trawienie PI-PLC. Dol-P bierze udział w syntezie GPI na etapie następującym po acetylacji. Na bezpośredni udział dolicholu w przyłączaniu reszt mannozy do struktury GPI wskazują doświadczenia ze znakowanym $[2\text{-}^3\text{H}]$ myo-inozytolem przeprowadzane na drożdżowym mutancie genu *DPM1* kodującego syntazę Dol-PMan. Mutanty *dpm1* zaburzone w syntezie Dol-PMan akumulowały intermediaty GPI pozbawione Man: GlcN-(acyl-P $[^3\text{H}]$ I, $[^3\text{H}]$ myo-inozytol oraz $[^3\text{H}]$ GlcN. Wynik ten wskazuje, że Dol-PMan jest donorem reszt mannozy niezbędnej do utworzenia funkcjonalnej formy GPI [63]. Białka katalizujące przeniesienie reszt mannozy z Dol-PMan na kotwicę GPI nie są w pełni scharakteryzowane. Za ten etap syntezy odpowiadają trzy rodzaje transferaz dołączające reszty mannozy z utworzeniem różnych rodzajów wiązań. W linii komórek ludzkich scharakteryzowano białko przenoszące pierwszą mannozę na kotwicę GPI (GPI-MT-I)-PIG-M. Scharakteryzowanie tego białka było szczególnie istotne. Udowodniono, że ssacza GPI-MTI wykorzystuje inny substrat niż z *Trypanosoma brucei* (odpowiednio GlcN-acylPI i GlcN-PI), syntetyczne analogi substratu GPI-MT-I hamowały mannozylację u *T. brucei* [64]. Z tego względu regulacja aktywności enzymu katalizującego przeniesienie pierwszej reszty mannozy z Dol-PMan na kotwicę GPI może być istotna w opracowaniu skutecznej chemioterapii przeciwko malarii. W komórkach ssaczyc scharakteryzowano również trzecią mannozylotransferazę (GPI-MT III) przenoszącą trzecią resztę mannozy z Dol-PMan na 2Man α 1-6Man α 1-4 NGlc-myoinozytol-lipid. Jest to białko Pig-B, jego drożdżowym ortologiem jest białko Gpi10 [65-66].

Podsumowanie

Długołańcuchowe lipidy biorące udział w modyfikacji białek są niezbędne dla funkcjonowania komórki. Mimo poznania struktury *cis*-PT bakteryjnej wciąż nie jest do końca wyjaśniony mechanizm decydujący o różnorodności budowy tych związków u różnych gatunków a nawet w obrębie tego samego rodzaju komórek. Otwarte pozostaje również poznanie przebiegu syntezy dolicholi grzybów nitkowatych, różniących się budową (porównaj wyżej) od występujących w komórkach drożdży i ssaczyc. Ponadto m.in. nasze ostatnie badania (*Yeast FEMS Research*) wskazują na związek pomiędzy biosyntezą dolicholi i dolicholo-zależnymi glikozylacjami białek oraz syntezą GPI i integralnością ściany ko-

mórkowej drożdży. Dlatego też poznanie mechanizmów regulujących syntezę lipidowych nośników reszt cukrowych pozostaje wciąż ciekawym tematem do dalszych badań.

Podziękowania

Dziękuję Pani prof. dr hab. Grażynie Palamarczyk za pomoc i cenne uwagi pomocne w opracowaniu artykułu.

Artykuł otrzymano 13 marca 2003

Zaakceptowano do druku 27 czerwca 2003

Piśmiennictwo

1. Chojnacki T, Dallner G (1988) *Biochem J* 251: 1-9
2. Dimster-Denk D, Rine J, Phillips J, Scherer S, Cundiff P, DeBord K, Gilliland D, Hickman S, Jarvis A, Tong L, Ashby MJ (1999) *Lipid Res* 40(5): 850-60
3. Goldstein JL, Brown MS (1990) *Nature* 343(6257): 425-30.
4. Palamarczyk G (1987) *Post Bioch* 33: 297-307
5. Bugg TD, Brandish PE (1994) *FEMS Microbiol Lett* 119 (3): 255-62
6. Stryer L (1988) *Biochemistry*. WH Freeman and Company/New York, str 555
7. Ranjan R, Świeżewska E, Chojnacki T (2001) Printed by Warszawska drukarnia Naukowa PAN
8. Barr RM, Hemming FW (1972) *Biochem J* 126: 1193-1202
9. Kato J, Fujisaki S, Nakajima K, Nishimura Y, Sato M, Nakano A (1999) *J Bacteriol* 181(9): 2733-8
10. Sato M, Sato K, Nishikawa S, Hirata A, Kato J, Nakano A (1999) *Mol Cell Biol* 19(1): 471-83
11. Schenk B, Fernandez F, Waechter ChJ (2001) *Glycobiology* 1(5): 61R-70R
12. Krag SS (1998) *Biochem Biophys Res Commun* 243: 1-5
13. Schenk B, Rush JS, Waechter ChJ, Aebi M: (2001) *Glycobiology* 11 (1): 89-98
14. Szkopińska A, Grabińska G, Delorume D, Karst F, Rytka J, Palamarczyk G (1997) *J Lipid Res* 38: 962-968
15. Ogura K, Koyama T (1998) *Chem Rev* 98(4): 1263-1276
16. Adair WL, Cafmeyer N (1987) *Arch Biochem Biophys* 259 (2): 589-596
17. Fujihashi M, Zhang YW, Higuchi Y, Li XY, Koyama T, Miki K (2001) *Proc Natl Acad Sci USA* 98(8): 4337-42
18. Ko TP, Chen YK, Robinson H, Tsai PC, Gao YG, Chen APC, Wang AHJ, Liang PH (2001) *J Biol Chem* 276(50): 47474-47482
19. Sato M, Fujisaki S, Sato K, Nishimura Y, Nakano A (2001) *Genes Cells* 6: 495-506
20. Kornblatt JA, Rudney H (1971) *J Biol Chem* 246: 4424-30
21. Hiser L, Basson ME, Rine, J (1994) *J Biol Chem* 269: 31383-9;
22. Servouse M, Karst F (1986) *Biochem* 240: 541-7
23. Basson ME, Thorsness M, Rine J (1986) *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 5563-7
24. Oulmouden A, Karst F (1990) *Gene* 88: 253-7
25. Tsay YH, Robinson GW (1991) *Mol Cell Biol* 11: 620
26. Chambon C, Ladeveze V, Servouse M, Blanchard L, Javelot C, Vladescu B, Karst F (1991) *Lipids* 26: 633-6
27. Berges T, Guyonnet D, Karst F (1997) *J Bacteriol* 179: 4664-70

28. Daum G, Lees ND, Bard M, Dickson R (1998) *Yeast* **14**: 1471-1510
29. Lichtenthaler HK (2000) Edited by Harwood J (School of Biosciences, Cardiff University) and Quinn PJ (Division of Life Sciences, King's College London)
30. Anderson MS, Muehlbacher M, Street IP, Profitt J, Poulter CD (1989) *J Biol Chem* **264**: 19169-75
31. Anderson MS, Yarger JG, Burck CL, Poulter CD (1989) *J Biol Chem* **264**: 19176-84
32. Chambon C, Ladeveze V, Oulmouden A, Servouise M, Karst F (1990) *Curr Gene* **18**: 41-6
33. Blanchard L, Karst F (1993) *Gene* **125**: 185-9
34. Tateyama S, Sagami H (2001) *Biochem (Tokyo)* **129**: 297-302
35. Szkopinska A, Nowak L, Swieczewska E, Palamarczyk G (1988) *Arch Biochem Biophys* **266**: 124-31
36. Szkopinska A, Karst F, Palamarczyk G (1996) *Biochimie* **7**: 111-6;31
37. Heller L, Orlean P, Adair WL Jr (1992) *Proc Natl Acad Sci USA* **89**(15): 7013-6
38. Helenius J, Ng DTW, Marolda CL, Walter P, Valvano MA, Aebi M (2002) *Nature* **415**: 447-45.
39. Burda P, Aebi M (1999) *Biochim Biophys Acta* **1426**: 239-257
40. Knauer R, Lehle L (1999) *Biochim Biophys Acta* **1426**: 259-273
41. Sentandreu R, Northcote DH (1969) *Carbohydr. Res* **10**: 584-585
42. Orlean P (1990) *Mol Cell Biol* **10**: 5796-5805
43. Gentzsch M, Tanner W (1996) *EMBO J* **15**(21): 5752-9
44. Strahl-Bolsinger S, Gentzsch M, Tanner W (1999) *Biochim Biophys Acta* **1426**: 297-307
45. Conzelmann A, Riezman H, Desponds C, Bron C (1988) *EMBO J* **7**: 2233-2240
46. Cross GAM (1990) *Annu Rev Cell Biol* **6**:1-36
47. Ferguson MAJ, Williams AF (1988) *Annu Rev Biochem* **57**: 285-320
48. Low MG (1989) *FASEB J* **3**: 1600-1608
49. Thomas JR, Dwek RA Rademacher TW (1990) *Biochemistry* **29**: 5413-5422
50. Caras IW, Weddell GN, Davitz MA, Nussenzweig V, Martin DW (1987) *Science* **238**(4831): 1280-3
51. Moran P, Caras IW (1991) *J Cell Biol* **115**(6):1595-600
52. Gerber LD, Kodukula K, Udenfriend S (1992) *J Biol Chem* **267**(17): 12168-73
53. Nuoffer C, Horvath A, Riezman H (1993) *J Biol Chem* **268**(14): 10558-63
54. Furukawa Y, Tsukamoto K, Ikezawa H (1997) *Biochim Biophys Acta* **1328**(2): 185-96
55. Conzelmann A, Fankhauser C, Puoti A, Desponds C (1991) *Cell Biol Int Rep* **15**: 863-873
56. Ferguson MAJ, Homans SW, Dwek RA, Rademacher TW (1988) *Science* **239**: 753-759
57. Roberts WL, Santikarn S, Reinhold VN, Rosenberry TL (1988) *J Biol Chem* **263**: 18776-18784
58. Frankhauser C, Homans SW, Thomas Oates JE, McConville MJ, Desponds C, Conzelmann A, Ferguson MA (1993) *J Biol Chem* **268**: 26365-26374
59. Doering TL, Masterson WJ, Englund PT, Hart GW (1989) *J Biol Chem* **264**: 11168-11173
60. Hirose S, Ravi L, Hazra S, Medof ME (1991) *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 3762-3766
61. Stevens VL, Raetz CRH (1991) *J Biol Chem* **266**: 10039-10042
62. Roberts WL, Myher JJ, Kuksis A Low MG, Rosenberry TL (1988) *J Biol Chem* **263**: 18766-18775
63. Costello LC, Orlean P (1992) *J Biol Chem* **267**(12): 8599-8603
64. Smith TK, Sharma DK, Crossman A, Dix A, Brimacombe JS, Ferguson MA (1997) *EMBO J* **16**(22): 6667-75
65. Takahashi M, Inoue N, Ohishi K, Maeda Y, Nakamura N, Endo Y, Fujita T, Takeda J, Kinoshita T (1996) *EMBO J* **15**(16): 4254-61
66. Sutterlin C, Escribano MV, Gerold P, Maeda Y, Mazon MJ, Kinoshita T, Schwarz RT, Riezman H (1998) *Biochem J* **332**: 153-9

Charakterystyka karboksygenazy-oksygenazy rybulozo-1,5-bisfosforanu (rubisko). Kierunki badań

Characterisation of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (rubisco). Direction of studies

RAFAŁ BARTOSZEWSKI¹, IZABELA ŁACZMAŃSKA¹, JAROSŁAW KRÓLICZEWSKI², ANDRZEJ SZCZEPANIAK³

Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Przyczyny bifunkcyjności rubisko
- III. Zmienność gatunkowa a współczynnik specyficzności rubisko
- IV. Struktura
- V. Mechanizm reakcji enzymatycznej
- VI. Rola małej podjednostki
- VII. Modyfikacje genetyczne w dużej podjednostce
- VIII. Podsumowanie

Contents:

- I. Introduction
- II. Bifunction of rubisco
- III. Diversity of rubisco among species
- IV. The structure of rubisco
- V. Mechanism of enzyme reaction
- VI. Function of small subunit
- VII. Genetic modification of large subunit
- VIII. Final remarks

Wykaz stosowanych skrótów: ATP — trifosforan adenozy; Ch.r. *Chlamydomonas reinhardtii*; K_c stała Michaelisa karboksylicacji; $k_{cat}(C)$ stała reakcji karboksylicacji; $k_{cat}(O)$ — stała reakcji oksygenacji; K_o — stała Michaelisa oksygenacji; L — duża podjednostka rubisko; NADH — zredukowany nukleotyd nikotynamidoadeninowy; NADPH — zredukowany fosforan nukleotydu nikotynamidoadeninowego; *rbcL* — gen kodujący dużą podjednostkę rubisko; *rbcS* — gen kodujący małą podjednostkę rubisko; Rh.r — *Rhodospirillum rubrum*; RuBP — rybulozo-1,5-bisfosforan; S — mała podjednostka rubisko; SF — współczynnik specyficzności; Syn — *Synechococcus*; v_c — szybkość reakcji karboksylicacji; V_c — maksymalna szybkość karboksylicacji; V_o — maksymalna szybkość oksygenacji; v_o — szybkość reakcji oksygenacji.

I. Wstęp

Istnienie organizmów żywych na Ziemi, a także funkcjonowanie całej biosfery oparte jest przede wszystkim na wykorzystaniu energii słonecznej, przekształcanej w energię wiązań chemicznych.

Konwersja ta odbywa się w procesie fotosyntezy, prowadzonym przez rośliny, glony oraz niektóre grupy bakterii. W czasie trwania fotosyntezy z atmosfery pobierany jest dwutlenek węgla, a uwalniany molekularny tlen (fotosynteza tlenowa, dominująca); istnieją także grupy mikroorganizmów, np. *Oscillochloris trichonides* używające energii świetlnej do produkcji związków organicznych a niewydzielające przy tym tlenu (fotosynteza beztlenowa) [1].

W procesie fotosyntezy bierze udział kilkadziesiąt białek funkcjonujących w błonie (faza jasna fotosyntezy) oraz w stromie chloroplastów *Eukaryota* albo w cytoplazmie u *Prokaryota* (faza ciemna fotosyntezy). Kluczowym, a zarazem najwolniejszym i limitującym wydajność etapem fotosyntezy jest przyłączenie cząsteczki dwutlenku węgla do rybulozo-1,5-bisfosforanu (RuBP). W efekcie powstaje nietrwały związek sześciowęglowy, rozkładany następnie do dwóch cząstek trójwęglowych kwasu 3-fosfoglicerynowego. Etap ten, zwany karboksylicacją, katalizowany jest przez karboksyłazę/oksygenazę rybulozo-1,5-bisfosforanu (rubisko, EC 4.1.1.39). W procesie tym jedyny istotny ilościowo, nieorganiczny węgiel (CO_2) włączany jest w obieg organiczny, a więc jest głównym ogniwem łączącym atmosferę i biosferę. Każdego roku organizmy fotosyntetyczne redukują do węglowodanów 10% atmosfery.

¹Mgr, ²dr, ³dr hab.; Instytut Biochemii i Biologii Molekularnej, Zakład Biofizyki, ul. Przybyszewskiego 63/77, 51-148 Wrocław, tel. 071 3752243, fax 071 3752234; rafal@bf.uni.wroc.pl, Jaroslaw.Kroliczewski@ibmb.uni.wroc.pl, Andrzej.Szczepaniak@ibmb.uni.wroc.pl

rycznego CO₂, daje to 10¹⁷ gramów związanego węgla na rok [2, 3]. Biorąc pod uwagę niską aktywność właściwą, aby związać tą ilość CO₂ wymagane jest około 4×10¹³ g białka, a więc rubisko jest najbardziej rozpowszechnionym białkiem na Ziemi i stanowi 0,2% wszystkich białek [4, 5]. Enzym ten to ponad 50% białek rozpuszczalnych liścia [4].

Z tych powodów enzym ten skupił uwagę wielu naukowców. Wyizolowali go po raz pierwszy w 1947 roku W i l d m a n i B o n e r [5]. Obecnie w bazie danych „NCBI Entrez” zdeponowano ponad 3000 sekwencji dużej podjednostki rubisko (L) [6]. Gen kodujący dużą podjednostkę rubisko (*rbcL*) był pierwszym sklonowanym genem kodowanym przez DNA chloroplastowe [7]. Geny kodujące małą podjednostkę rubisko (*rbcS*) były pierwszą grupą roślinnych, jądrowych genów klonowanych, sekwencjonowanych i ekspresjonowanych [8]. Badania nad małą podjednostką Rubisko doprowadziły do odkrycia peptydu tranzytowego [9], N-terminalnej presekwencji, kierującej białko do chloroplastów. Badania nad powstawaniem holoenzymu z 8 dużych i 8 małych podjednostek doprowadziły natomiast do odkrycia białek opiekuńczych [10-12].

W 1971 roku odkryto, że enzym ten katalizuje dodatkowo drugą reakcję z udziałem tlenu, oksygenację rybulozo-1,5-bisfosforanu [13]. Jest to pierwsza reakcja w procesie fotorespiracji [14]. CO₂ i O₂ współzawodniczą o to samo miejsce i o substrat (RuBP) w centrum katalitycznym dużej podjednostki. Karboksylacja odpowiedzialna jest za asymilację CO₂, oksygenacja prowadzi do utraty CO₂ na drodze fotorespiracji i w konsekwencji obniża wydajność fotosyntezy [15]. Wykrycie bifunkcyjności rubisko zwiększyło zainteresowanie tym enzymem. Okazało się, że rozdział RuBP między fotosyntezę a fotooddychanie ma wpływ na wydajność pierwszego z tych procesów. Zmodyfikowanie rubisko tak, by nie katalizowała ona utleniania substratu, znacznie poprawiłoby produktywność roślin. Stało się to ważnym aspektem badań [16].

II. Przyczyna bifunkcyjności rubisko

Fotosynteza jest procesem, który powstał w warunkach beztlenowych. Pierwszymi organizmami fotosyntezującymi były najprawdopodobniej organizmy beztlenowe, potem, około 3 miliardy lat temu, pojawiły się sinice, prowadzące fotosyntezę tlenową. Początkowo produkowany przez nie tlen reagował z oceanicznymi pokładami żelaza, gdy te się wyczerpały, zaczął przedostawać się do atmosfery. Dalsza ewolucja fotosyntezy przebiegała w warunkach tlenowych. Efektem tego jest między innymi bi-

funkcyjność kluczowego enzymu fazy ciemnej — rubisko.

Na początku pojawienia się tlenu w atmosferze zjawisko bifunkcyjności rubisko nie było zbyt dużym problemem, bo jakkolwiek CO₂ i O₂ są dla siebie inhibitorami kompetycyjnymi, to stężenie CO₂ było relatywnie duże w porównaniu do stężenia O₂. W trakcie upływu czasu tlenu zaczęło przybywać, a ilość dwutlenku węgla zaczęła maleć aż do wartości obserwowanych dzisiaj, gdy tlen stanowi 21% a dwutlenek węgla 0,03% ziemskiej atmosfery. W tych warunkach rubisko każdego fotoautotrofa jest również oksygenazą, katalizującą reakcję utleniania średnio 2,5-3 razy rzadziej niż karboksylację. Gdyby stężenia obu gazów były jednakowe, karboksylacja przebiegałaby jednak 80 razy częściej niż oksygenacja [2]. Szacuje się, że tak zwane fotooddychanie powoduje spadek wydajności fotosyntezy od 10% do 40 %, prowadzi ono bowiem do powstania z utlenionego RuBP cząsteczki 3-fosfoglicerynianu oraz fosfoglikolanu. Dwie cząsteczki fosfoglikolanu są następnie przekształcane w procesie, w którym zaangażowane są chloroplasty, mitochondria i peroksyzomy, poprzez gliksalan, glicynę i serynę do 3-fosfoglicerynianu, czemu towarzyszy uwolnienie CO₂. Jednocześnie zużywane są 4 cząsteczki ATP i 5 cząsteczek NADH (lub NADPH, zależnie od gatunku rośliny). Fizjologiczny sens tego procesu nie został jeszcze wyjaśniony [2].

III. Zmienność gatunkowa a współczynnik specyficzności rubisko

Stosunek karboksylacji do oksygenacji w danym enzymie opisuje współczynnik specyficzności (SF). Współczynnik ten najlepiej charakteryzuje zdolność enzymu do rozdziału substratu (RuBP) pomiędzy karboksylację a oksygenację:

$$SF = v_c/v_o = (V_c K_o / V_o K_c) ([CO_2]/[O_2]),$$

gdzie v_c i v_o to szybkości reakcji, V_c i V_o prędkości maksymalne, natomiast K_c i K_o stałe Michaelisa, odpowiednio karboksylacji i oksygenacji.

W dowolnym stężeniu CO₂ i O₂, SF określa powinowactwo rubisko do dwutlenku węgla i tlenu, wysoka wartość oznacza duże powinowactwo do CO₂ a małe do O₂, niska odwrotnie. Gatunki fotoautotrofów istotnie różnią się pod względem tego współczynnika. Wartości SF wynoszą od 9 dla enzymu izolowanego z anaerobowej bakterii do około 100 u roślin wyższych (Tabela 1). Jeżeli wartość SF jest mniejsza od 20 oznacza to, że enzym w obecności tlenu praktycznie nie przeprowadza karboksyla-

cji, a więc organizm wyposażony w taki enzym nie może żyć w warunkach tlenowych. Przykładem takiego organizmu jest bakteria purpurowa *Rhodospirillum rubrum* [17]. Innym interesującym organizmem jest *Rhodobacter spheroides*, u którego wystę-

hająca się w przedziale od 22 do 36 μM , jest znacząco niższa od wartości otrzymanej dla enzymu z *Synechococcus sp.* (167 μM), a podobna dla wartości otrzymanych dla enzymów roślin lądowych. Szczególnie wysokie wartości K_{O_2} (1600 i 1300 μM)

Tabela 1

Wartości współczynnika specyficzności (SF) wybranych gatunków roślin C_3 , C_4 , glonów, sinic, bakterii fotosyntetycznych, glonów morskich i termofilnych krasnorostów

Gatunek	SF	K_{CO_2} (μM)	Piśmienictwo
Rośliny C_3:			
<i>Spinacia oleracea</i>	80/100	14	[17]/[23]
<i>Nicotiana tabacum</i>	77/92	11	[17]/[24]
<i>Triticum sp.</i>	90/107		[25]/[26]
<i>Hordeum sp.</i>	87/100		[25]/[23]
<i>Quercus robur</i>	102	-	[27]
Rośliny C_4:			
<i>Zea mays</i>	78/96	34	[17]/[24]
<i>Amaranthus hybridus</i>	82	16	[17]
Glony zielone:			
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	61/70	29	[17]/[24]
<i>Scenedesmus obliquus</i>	63	38	[17]
<i>Euglena gracilis</i>	54	25	[17]
Sinice:			
<i>Synechococcus</i>	45	167	[24]
<i>Aphanizomenon flos-aquae</i>	48	105	[17]
Bakterie fotosyntetyczne:			
<i>Rhodospirillum rubrum</i>	15	89	[17]
<i>Rhodopseudomonas spheroides</i> II	9	80	[17]
<i>Rhodopseudomonas spheroides</i> I	62	36	[17]
Glony morskie:			
<i>Cylindrotheca N1</i>	106	31	[19]
<i>Cylindrotheca fusiformis</i>	111	36	[19]
<i>Porphyridium cruentum</i>	129	22	[19]
<i>Olisthodiscus luteus</i>	100	59	[19]
Termofilne krasnorosty:			
<i>Galdieria partita</i>	238	6,6	[20]
<i>Cyanidium caldarium</i>	225	6,7	[20]

pują dwa typy enzymu [18]. Pierwszy typ (L8S8) ma współczynnik SF wartością zbliżony do enzymu z zielonych glonów, drugi zbudowany z dwóch dużych podjednostek (L2) o niskim SF podobny jest do enzymu z *Rhodospirillum rubrum* (Tabela 1).

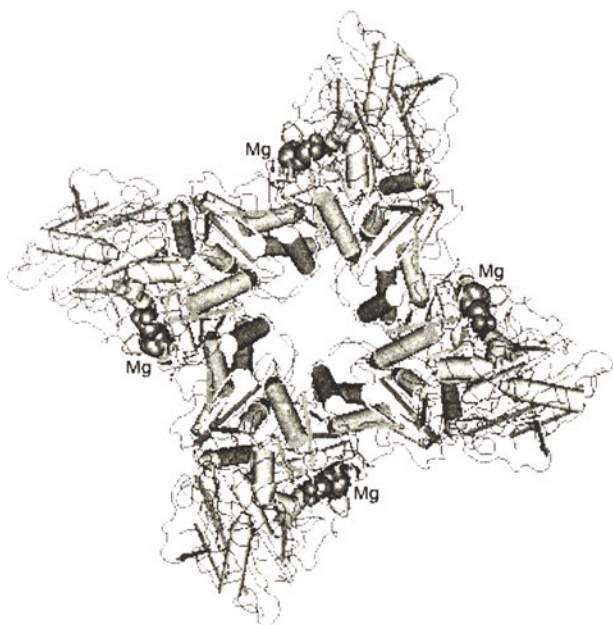
SF formy I rubisko u większości bakterii i glonów waha się między 45 a 70, u roślin wyższych między 77 a 102. Przez dłuższy czas sądzono, że rubisko z roślin wyższych jest najlepiej przystosowane do obecnych warunków atmosferycznych i wykazuje najwyższe wartości SF. Jednak ostatnio u pewnych glonów morskich odkryto enzymy o wartościach SF wahających się od 100 do 128 [19]. W Tabeli 1 podano parametry kinetyczne dla tych enzymów. Maksymalna prędkość karboksylacji u morskich glonów waha się od 0,67 do 1,67 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mg}^{-1} \text{ białka min}^{-1}$, są to wartości niższe w porównaniu do *Synechococcus sp.* (3,24 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mg}^{-1} \text{ białka min}^{-1}$). Wartość stałej Michaelisa (K_{CO_2}) u morskich glonów, wa-

wyказuje rubisko z *Porphyridium sp.* i *Cylindrotheca sp.* co oznacza, że tlen bardzo wolno przyłącza się do enediolowego metabolitu pośredniego. Ma to odzwierciedlenie w wysokiej wartości SF [19].

Jeszcze wyższe wartości SF wykazano u termofilnych krasnorostów *Galdieria partita* i *Cyanidium caldarium*, wynoszą one odpowiednio 238 i 222, i są wyższe od 2,4 do 2,5 razy od SF dla rubisko z roślin wyższych [20]. Oznacza to, że rubisko z tych krasnorostów przyłącza jedną cząsteczkę O_2 na 10 do 11 przyłączonych cząsteczek CO_2 , dla porównania enzym ze szpinaku przyłącza 1 cząsteczkę O_2 na cztery cząsteczki CO_2 . Wartości stałych Michaelisa (K_c) dla tych gatunków (odpowiednio 6 i 7 μM) są najmniejszymi opublikowanymi dotychczas wartościami. Enzymy z tych gatunków, w porównaniu do szpinaku, wykazują wartość specyficzności karboksylacji $[k_{\text{cat}}(\text{C})/K_c]$ większą o 30% i specyficzność oksygenacji $[k_{\text{cat}}(\text{O})/K_o]$ mniejszą o 50%.

Ważną cechą rubisko jest zależność współczynnika specyficzności od temperatury, maleje on stosunkowo szybko wraz z jej wzrostem [20]. Współczynnik SF dla *Galdieria partita* w temperaturze 15°C wynosi 364, a obniża się do 130 w temperaturze 35°C i do 65 w temperaturze 45°C. Dla szpinaku zmienia się od 128 w temperaturze 15°C do 69 w temperaturze 35°C [20]. Oznacza to, że wydajność fotosyntezy

zależy od struktury utworzonej przez duże podjednostki znajdują się pierścienie utworzone z 4 małych podjednostek [35] (Ryc. 1). Opisany heksadekamer to rozpuszczalne białko o łącznej masie cząsteczkowej około 550 kDa (przybliżona masa dużej podjednostki to 55 kDa a małej 15 kDa) [16, 37]. Ze względu na różnice w strukturze pierwszorzędowej w obrębie typu I enzymu wyróżnia się dwa podtypy: zielony —



Ryc. 1. Model rubisko typu I ze szpinaku na podstawie analizy krystalograficznej [33]. Rysunek wykonano w oparciu o dane zawarte w pliku pdb 1IR1 zawartym w bazie danych NCBI (www.ncbi.nih.gov), programem Cn3D 4.1.

maleje wraz ze wzrostem temperatury. Wyniki tych badań zwiększyły zainteresowanie karboksylazą/oksygenazą rybulozo-1,5-bisfosforanu izolowaną z organizmów termofilnych [21, 22].

IV. Struktura

Znana jest struktura rubisko na poziomie atomowym z archebakterii *Alcaligenes eutrophus* [28] i *Thermococcus kodakaraensis* [29], bakterii *Rhodospirillum rubrum* [30], sinicy *Synechococcus* PCC 6301 [31], glonów *Chlamydomonas reinhardtii* [6] i *Galdieria partita* [21], oraz roślin wyższych *Nicotiana tabacum* [32] i *Spinacia oleracea* [33]. W oparciu o wymienione struktury wyróżnia się trzy podstawowe typy rubisko: typ I, typ II [18, 34, 35] oraz niedawno opisany u hipertermofilnej archebakterii *Thermococcus kodakaraensis* typ III [36].

Najpowszechniej występującą w przyrodzie odmianą enzymu jest typ I — L8S8, złożony z 8 dużych (L) i 8 małych podjednostek (S). Rdzeń zorganizowany jest w 4 dimery, z których każdy zawiera po 2 zorientowane przeciwległe, duże podjednostki, między którymi tworzone są 2 miejsca aktywne. Na gó-

charakterystyczny dla roślin wyższych, niektórych sinic i glonów zielonych oraz czerwony — obecny u niektórych bakterii purpurowych i eukariotycznych glonów niezielonych [38]. Rubisko sklasyfikowane jako podtyp zielony ma, w porównaniu do podtypu czerwonego, krótszy C koniec oraz 12 dodatkowych aminokwasów położonych w centrum małej podjednostki [28].

Typ II — L2 enzymu to kompleks utworzony z dużych podjednostek L (około 55 kDa), których ilość zależy od organizmu i może wynosić od 2 do 8. Ta forma strukturalna jest szczególnie charakterystyczna dla bakterii purpurowych m.in. *Rhodospirillum rubrum* (L2) [39], *Rhodopseudomonas palustris* (L8) [35] i *Rhodobacter sphaeroides* (co ciekawe, występuje tu dodatkowo enzym typu I) [34] oraz fototroficznych dinofitów [40]. Warto nadmienić, iż rubisko u dinofitów kodowane jest w jądrze i syntetyzowane w postaci prekursora białkowego [41]. Podobnie jak w przypadku typu I enzymu, dwa centra aktywne tworzone są przez dimer dużych podjednostek [39].

Jedynym jak dotąd znanym organizmem zawierającym rubisko typu III — (L2)₅ jest hipertermofilna archebakteria — *Thermococcus kodakaraensis*.

W organizmie tym występuje enzym w postaci dekamerycznej struktury, o kształcie pierścienia, utworzonej jedynie z dimerów dużych podjednostek [29] (Ryc. 2).

Związanie RuBP powoduje szereg, następujących kolejno, zmian konformacyjnych zamykających dostęp do centrum aktywnego. Pętla 6 przesuwa się nad substrat a następnie, prostopadłe do niej, ustawia się



Ryc. 2. Model rubisko typu III z *Thermococcus kodakarensis* na podstawie struktury krystalicznej [29]. Rysunek wykonano w oparciu o dane zawarte w pliku pdb 1GEH zawartym w bazie danych NCBI (www.ncbi.nih.gov), programem Cn3D 4.1.

V. Mechanizm reakcji enzymatycznej

Miejsce aktywne enzymu w homodimerze L_2 tworzą: długi C-końcowy fragment jednej (L_A), oraz kilka reszt z N końca drugiej dużej podjednostki (L_B) [42]. W oparciu o porównanie struktur krystalicznych miejsc aktywnych wolnych oraz ze związanym substratem stwierdzono, że trzy elementy miejsca aktywnego zmieniają swoje położenie podczas przebiegu reakcji: pętla 6 podjednostki L_A (około 10 reszt aminokwasowych), konserwatywna reszta lizyny w L_B (u szpinaku K128) oraz C-końcowy fragment L_A , tworzony przez co najmniej 10 aminokwasów [43].

Wskutek przyłączenia CO_2 do położonej w otoczeniu aminokwasów o charakterze kwaśnym, pozbawionej ładunku grupy α -aminowej specyficznej reszty lizyny (K201 u szpinaku), powstaje karbaminian, który następnie poprzez związanie jonu metalu dwuwartościowego (Mg^{2+}) tworzy dodatnio naładowany związek chelatowy i enzym przechodzi w formę aktywną [3, 44]. Związany jon metalu ma wiele funkcji: orientuje substrat w pozycji dogodnej do katalizy, pełni rolę akceptora elektronu, oraz stabilizuje powstające związki pośrednie [3].

łańcuch boczny konserwatywnej lizyny z L_B . Tak powstała struktura jest, na koniec, unieruchamiana przez zakrywający ją, prawie całkowicie rozciągnięty C-końcowy fragment. Nie ustalono dotychczas czy opisana zmiana konformacji blokuje dostęp substratom gazowym (CO_2 i O_2) do centrum aktywnego [32, 43, 45, 46].

Pierwszym etapem reakcji katalizowanej przez rubisko jest utworzenie w zamkniętym centrum aktywnym enediolowego metabolitu pośredniego, który reaguje z CO_2 lub z O_2 . Po utworzeniu produktów końcowych centrum aktywne wraca do konformacji otwartej, co pozwala na uwolnienie produktów i wprowadzenie nowej cząsteczki RuBP [42, 47].

Istnieje hipoteza, że C-końcowy fragment, w aktywnym enzymie bez RuBP, stale otwiera i zamyka dostęp do centrum aktywnego. Postuluje się, że czas cyklu od otwarcia jest różny dla różnych organizmów i ma wpływ na SF. Krótki czas otwarcia preferuje wiązanie CO_2 (niska K_c), a długi O_2 (wysoka K_o) [48].

W reakcji karboksylacji powstaje 2'-karboksy-3-keto-D-arabinitolo-1,5-bisfosforan — sześciowęglowy związek pośredni, którego hydratacja prowa-

dzi do utworzenia nietrwałego wiązania diolowego przy C-3. Po rozerwaniu tego wiązania powstaje cząsteczka kwasu 3-fosfoglicerynowego oraz karbanyon, który na skutek protonacji tworzy drugą cząsteczkę kwasu 3-fosfoglicerynowego [47, 49].

Na skutek reakcji oksygenacji tworzy się pięciowęglowy związek pośredni o charakterze wodorotlenku. Po hydratacji tego związku powstaje wiązanie diolowe przy C-3, którego rozerwanie prowadzi do utworzenia cząsteczki kwasu 3-fosfoglicerynowego oraz związku dwuwęglowego – fosfoglikolanu [3, 50].

Dokładne zrozumienie mechanizmu opisanych tu zmian konformacyjnych, towarzyszących reakcji katalizowanej przez rubisko, jest jednym z warunków uzyskania ulepszanego enzymu.

VI. Rola małej podjednostki

Mała podjednostka odgrywa rolę strukturalną stabilizując oktametryczną strukturę rdzenia zbudowanego z dużych podjednostek [51], ale również ma znaczny wpływ na właściwości katalityczne enzymu. W porównaniu do dużej podjednostki, małe podjednostki są bardziej zróżnicowane (homologia dużych podjednostek roślin wyższych wynosi 90%, małych 70%), dlatego mogą być powodem różnic w SF pomiędzy tymi enzymami z różnych gatunków. Przy braku małej podjednostki wydajność reakcji katalizowanej przez rdzeń składający się z ośmiu dużych podjednostek (L8) zredukowana jest do kilku procent (poniżej 3%) [52-55]. Do rdzenia (L8) można przyłączyć małe podjednostki i odtworzyć w pełni funkcję katalityczną [52]. Sinicowa duża podjednostka ekspresjonowana w *Escherichia coli* bez małej podjednostki tworzy oktameryczny (L8) o prawidłowej strukturze wykazując zmniejszenie k_{cat} do 1%, bez zmiany współczynnika specyficzności [56, 57]. Wpływ małej podjednostki na aktywność enzymatyczną potwierdziły badania polegające na tworzeniu enzymu hybrydowego na drodze jednoczesnej ekspresji w *Escherichia coli* dużej podjednostki z sinicy i małej podjednostki z innego gatunku. Do sinicowego rdzenia enzymu (L8) przyłączono małe podjednostki ze szpinaku [58], pszenicy [59], morskich okrzemek [60], ryżu, tytoniu i pszenicy [61] oraz bakterii *Alcaligenes eutrophus* [62]. We wszystkich przypadkach otrzymany enzym hybrydowy miał niższą aktywność niż natywny holoenzym sinicowy. Współczynnik specyficzności był obniżony lub zbliżony do SF sinicy, a tylko w przypadku enzymu hybrydowego z udziałem małych podjednostek z morskiej okrzemki był większy o 60% [60]. Wykaza-

no też dodatni wpływ małej podjednostki na powinowactwo enzymu do CO_2 i RuBP [61]. Hybrydowe rubisko uzyskano również w roślinach transgenicznym. W tytoniu w wyniku transformacji plastydów otrzymano hybrydowe rubisko posiadające dużą podjednostkę z kukurydzy i małą z tytoniu. Szybkość reakcji uzyskanego enzymu hybrydowego była zmniejszona czterokrotnie przy nieznacznej zmianie SF [63]. Genem z grochu kodującym małą podjednostkę rubisko transformowano *Arabidopsis sp.* W wyniku transformacji przynajmniej jedna mała podjednostka z grochu znajdowała się w enzymie, co powodowało obniżenie aktywności karboksylazowej o 11% [64].

Ukierunkowane mutacje w małej podjednostce nie powodowały znacznych zmian lub obniżały stabilność enzymu i wydajność katalityczną karboksylacji (k_{cat}/K_C) [42, 65-67]. Chociaż mutacje w małej podjednostce wykazały ograniczony wpływ na aktywność katalityczną, nie powinna ona być ignorowana przy próbach poprawienia SF rubisko [68].

Interesująca jest rola małej podjednostki w biosyntezie dużej podjednostki. Przy braku małej podjednostki ekspresja kodowanej w chloroplastach dużej podjednostki jest hamowana na poziomie translacji [69]. Badania wykazały, że liczebność małej podjednostki reguluje akumulację dużej poprzez wpływ na inicjację translacji genu *rbcl* [67].

VII. Modyfikacje genetyczne w dużej podjednostce

W oparciu o porównanie sekwencji, chemiczne modyfikacje i badania z zastosowaniem mutacji punktowej, poznano cechy centrum aktywnego rubisko i określono reszty aminokwasowe budujące centrum jeszcze przed poznaniem struktury trójwymiarowej enzymu [70]. Poznanie struktur krystalograficznych [6, 21, 28-33], lepsze zrozumienie mechanizmu reakcji enzymatycznej [71], określenie sekwencji dużej liczby enzymów o różnym SF zintensyfikowało badania pozwalając na lepszy, celowy wybór miejsc mutacji punktowej. Celem tych badań była taka modyfikacja rubisko, która poprawiłaby parametry kinetyczne enzymu, w konsekwencji zwiększając wydajność fotosyntezy. Znane są liczne przykłady mutacji rubisko generowanych *in vitro* i *in vivo*, które zmieniły aktywność enzymu zarówno korzystnie jak i nie korzystnie (Tabela 2). Prawie wszystkie przykłady opisują metagenezę enzymu ekspresjonowanego w bakterii *Escherichia coli* lub zielonym glonie *Chlamydomonas reinhardtii* [42, 49, 65]. Gen z *Rhodospirillum rubrum* oraz sinicowy

operon z *Synechococcus* PCC6301 kodujący dużą i małą podjednostki są używane najczęściej, ponieważ łatwo tworzą aktywny kompleks w *Escherichia coli* [72, 73]. W przeciwieństwie do enzymu z sinic, rubisko z roślin wyższych ekspresjonowane w *Escherichia coli* nie tworzy aktywnego enzymu [74].

Większość mutacji wprowadzanych w centrum aktywnym ma negatywne skutki (Tabela 2). Mutacje korzystne dla jednego gatunku często były niekorzystne dla innego. Mutacja S379A w pętli 7 w *Rhodospirillum rubrum* powodowała wzrost wartości SF o 60%, ale jednocześnie 50 razy spadała aktywność karboksylazowa [75]. Identyczna mutacja

w *Chlamydomonas reinhardtii* obniżała SF o 70%, a aktywność karboksylazową 25 razy [76]. Prawdopodobnie potrzebne jest więcej niż kilka zmian w sekwencji enzymu, aby „poprawić” rubisko. Dotychczasowe badania, chociaż dostarczyły bardzo dużo informacji o zależności struktury pierwszorzędowej od funkcji wciąż nie pozwalają na zaprojektowanie lepszego enzymu. Obecnie w większej mierze skupiono się na dalszym poszukiwaniu lepszych enzymów w przyrodzie [38], jest bowiem prawdopodobne, że enzymy wykazujące jeszcze większe zróżnicowanie sekwencji pozwolą zaprojektować poprawione rubisko.

Tabela 2

Przykłady mutacji wprowadzonych do rubisko. Dane pochodzą z wielu źródeł, dlatego pojawiają się różnice w SF dla tego samego gatunku. Skróty: n. oznacza wartość niemierzalną, Ch. r – *Chlamydomonas reinhardtii*, Rh. r – *Rhodospirillum rubrum*, Syn – *Synechococcus* sp.

Mutacja	Gatunek	Fragment struktury	SF typu dzikiego	SF mutanta	Piśmiennictwo
R217S	Ch.r	Helisa α 2	67	n.m.	[77]
R217S/A242V	Ch.r	Helisa α 2/β łańcuch 3	67	33	[77]
N123G	Ch.r	Domena N-terminalna	64	12	[16]
V341I	Ch.r	Pętla 6	66	64	[78]
M349L	Ch.r	Pętla 6	66	62	[78]
L326I	Ch.r	Pętla 6	66	60	[78]
L326V/M439L	Ch.r	Pętla 6	66	52	[78]
V331A/T342I	Ch.r	Pętla 6	62	49	[79]
V331A/G334S	Ch.r	Pętla 6	62	45	[79]
V331A	Ch.r	Pętla 6	62	36	[79]
S379A	Ch.r	Pętla 7	64	18	[76]
P290L	Ch.r	Podjednostka L	62	54	[80]
N54A	Rh.r	Domena N-terminalna	11	9	[16]
T53A	Rh.r	Domena N-terminalna	11	7	[16]
N54W	Rh.r	Domena N-terminalna	11	6	[16]
M330L	Rh.r	Pętla 6	7,2	7,7	[16]
S368A	Rh.r	Pętla 7	11	17	[75]
F327V	Rh.r	Sąsiedztwo pętli 6	9,9	9,0	[45]
F327L	Rh.r	Sąsiedztwo pętli 6	9,9	11,5	[45]
F327A	Rh.R	Sąsiedztwo pętli 6	9,9	10,9	[45]
F327G	Rh.r	Sąsiedztwo pętli 6	9,9	10,4	[45]
F327W	Rh.r	Sąsiedztwo pętli 6	9,9	10,2	[45]
K125G	Syn	Domena N-terminalna	46	38	[16]
D335E	Syn	Pętla 6	46	48	[16]
V328A	Syn	Pętla 6	46	45	[16]
K336P	Syn	Pętla 6	39	38	[16]
V328G	Syn	Pętla 6	56	20	[16]
K125Q	Syn	Domena N-terminalna	46	7	[16]
K125H	Syn	Domena N-terminalna	46	6	[16]
K125D	Syn	Domena N-terminalna	46	5	[16]
K125R	Syn	Domena N-terminalna	46	42,5	[16]
T65S	Syn	Domena N-terminalna	43	37	[16]
T65A	Syn	Domena N-terminalna	43	22	[16]
T65V	Syn	Domena N-terminalna	43	19	[16]
VDL(346-348)YHT	Syn	Helisa α 6	38,3	n.m.	[81]

KAS(338-341)REI	Syn	Helisa α 6	38,3	40,6	[81]
L343K		Helisa α 6	38,3	31,2	[81]
KASTL(339-343)PLMIK	Syn	Helisa α 6	38,3	24,4	[81]
T342A	Syn	Pętla 6	56	n.m.	[82]
V331I	Syn	Pętla 6	56	n.m.	[82]
K334C	Syn	Pętla 6	56	n.m.	[82]
K334M	Syn	Pętla 6	56	n.m.	[82]
T324I	Syn	Pętla 6	56	52	[82]
T324L	Syn	Pętla 6	56	52	[82]
T324M	Syn	Pętla 6	56	50	[82]
V331L	Syn	Pętla 6	56	49	[82]
V331A	Syn	Pętla 6	56	30	[82]
V331G	Syn	Pętla 6	56	20	[82]
V331M	Syn	Pętla 6	56	16	[82]
K334R	Syn	Pętla 6	56	0,3	[82]
S341M	Syn	Sąsiedztwo pętli 6	39	42	[19]
K339P	Syn	Sąsiedztwo pętli 6	39	38	[19]
A340L	Syn	Sąsiedztwo pętli 6	39	36	[19]
T342I	Syn	Sąsiedztwo pętli 6	39	31	[19]
F92L	Syn	Mała podjednostka	40,8	44,6	[60]
G91V	Syn	Mała podjednostka	40,8	41	[60]
I87V	Syn	Mała podjednostka	40,8	39,5	[60]
R88K	Syn	Mała podjednostka	40,8	38,5	[60]

VIII. Podsumowanie

Mechanizm reakcji katalitycznej przeprowadzanej przez rubisko jest dobrze poznany [3], również struktura krystalograficzna enzymu została określona dla szeregu gatunków [6, 21, 28-33]. Jednakże nadal nie jesteśmy w stanie zaprojektować lepszego enzymu. Wciąż nie jest wystarczająco dobrze poznana zależność pomiędzy strukturą a funkcją rubisko. Badania genetyczne wskazują, że lepszego enzymu nie można uzyskać poprzez zmianę kilku aminokwasów. Zmiany powinny dotyczyć całych regionów dużej podjednostki i prawdopodobnie również małej podjednostki. Ta droga okazała się bardzo trudna i wymaga dalszych intensywnych badań.

Inną drogą jest szukanie w przyrodzie wariantów rubisko o lepszych parametrach kinetycznych. Zmienność gatunkowa rubisko została wykazana już dawno [17], a ostatnie wyniki napawają optymizmem [19]. Szczególnie interesujące są organizmy termofilne [20]. Może uda się połączyć fragment lepszego enzymu z częścią słabego enzymu i tą drogą uzyskać lepsze rubisko.

Alternatywą jest przeniesienie genu z jednego gatunku do innego, ważnego dla rolnictwa. Nie jest to łatwe zadanie ze względu na trudności z transformacją chloroplastów. Dotychczas tylko nieliczne genomy chloroplastowe były transformowane, w tym z *Chlamydomonas reinhardtii* i tytoniu [83]. Ponadto prawdopodobnie należy wyeliminować z genomu jądrowego rodzinę genów *rbcS* oraz dezaktywować lub modyfikować gen aktywazy rubisko. Powiodła się transformacja genomu chloroplastowego tytoniu operonem *rbcLS* z krasnorostu i z okrzemki. W chloroplastach tych organizmów zachodziła wydajna

ekspresja, ale nie powstawał aktywny enzym [84]. Duża podjednostka była całkowicie nierozpuszczalna, wskazuje to na brak drogi fałdowania enzymu z tych gatunków w chloroplastach roślin wyższych. Pełnym sukcesem zakończyła się transformacja chloroplastów tytoniu genem kodującym rubisko typu II z *Rhodospirillum rubrum*. Niskie SF tego enzymu (Tabela 1) spowodowało, że transgeniczne rośliny mogły rosnąć tylko w atmosferze wzbogaconej CO₂ do 2,5% [85]. Należałoby więc znaleźć do transformacji gen kodujący enzym o lepszych parametrach, który ulegałby ekspresji i formował aktywny enzym w chloroplastach roślin wyższych, co też nie jest łatwym zadaniem.

Artykuł otrzymano 8 maja 2003

Zaakceptowano do druku 23 czerwca 2003

Piśmiennictwo

- Ivanovsky RN, Fal YI, Berg IA, Ugolkova NV, Krasilnikova EN, Keppen O, Zakharchuc LM, Zyakun, AM (1999) *Microbiology* **145** (Pt 7): 1743-1748
- Whitmarsh JG (1999) W: *Photosynthesis and Photomorphogenesis*, (red) Singhal GS, Sopory SK, Irrgang K, Govindjee, New Delhi and Dordrecht: Narosa Publishers and Kluwer Academic str 11-51
- Cleland WW, Andrews TJ, Gutteridge S, Hartman FC, Lorimer GH (1998) *Chem Rev* **98**: 549-562
- Ellis RJ (1979) *Trends Biochem Sci* **4**: 241-244
- Wildman SG, Bonner, J (1947) *Arch Biochem Biophys* **14**: 381-413
- Taylor TC, Backlund A, Bjorhall K, Spreitzer RJ, Andersson I (2001) *J Biol Chem* **276**: 48159-48164
- McIntosh L, Poulsen C, Bogorad L (1980) *Nature* **288**: 556-560
- Dean C, Pichersky E, Dunsmuir P (1989) *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **40**: 415-439
- Schmidt GW, Devillers-Thierry A, Desruisseaux H, Blobel G, Chua NH (1979) *J Cell Biol* **83**: 615-622

KOMUNIKAT ZARZĄDU GŁÓWNEGO

POLSKIEGO TOWARZYSTWA BIOCHEMICZNEGO

Dotyczący składek członkowskich i prenumeraty „Postępów Biochemii” w roku 2003

Składka członkowska w 2003 roku wynosi:

dla Członków rzeczywistych 80.- zł.

dla Członków studentów 40.- zł

w tym roczna prenumerata „Postępów Biochemii”.

Małżeństwa mogą opłacać składki w wysokości 80. + 40. = 120 zł.

Członkowie, którzy opłacą składkę członkowską do 30 czerwca 2003, mają zapewnioną bezpłatną prenumeratę kwartalnika Polskiego Towarzystwa Biochemicznego „Postępy Biochemii”. Członkowie, którzy opłacą składkę po tym terminie, będą mogli otrzymywać kwartalnik do czasu wyczerpania się zapasów magazynowych.

Powyższe zmiany nie dotyczą Członków Honorowych Towarzystwa.

Natomiast Członkowie-Emeryci – nadal zwolnieni z opłacania składki członkowskiej – płacą za prenumeratę „Postępów Biochemii” 30.- zł.

Osoby niebędące członkami Towarzystwa mogą być prenumeratorami „Postępów Biochemii”. Koszt w 2003 roku — 80 zł.

Biblioteki płacą za prenumeratę „Postępów Biochemii” w roku 2003 120.- zł.

Prosimy o wnoszenie opłat bez wezwania na nasze konto w BPH PBK S.A. III Oddz. Warszawa nr 11101053-411050000371.

Jolanta Barańska

Prezes Polskiego Towarzystwa Biochemicznego

POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE

ZAPROSZENIE

Jeżeli chciałabyś/chciałbyś zapisać się na listę e-mailową Polskiego Towarzystwa Biochemicznego wyślij e-mail na adres: infoptbioch@nencki.gov.pl. W polu „subject”, umieść swoje nazwisko i imię (w takiej kolejności i bez polskich znaków diakrytycznych) oraz adres e-mailu. Wysyłając taki mail zgadzasz się na to, aby na Twój adres e-mailowy przychodziły informacje ZG, listy pojedynczych lub grup członków do ogółu członków, informacje z FEBS o zjazdach i kursach oraz materiały reklamowe. Lista będzie rozsyłać materiały kontrolowane przez moderatora, którym będzie Adam Szewczyk, sekretarz Zarządu Głównego Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, tak więc nie będzie Ci grozić zalew śmieciowej poczty i zawirusowanych „attachmentów”. Mam nadzieję, że tą drogą poprawi się stan poinformowania naszych członków o różnych wydarzeniach naukowych, stypendiach, kursach i wreszcie o aktywności poszczególnych oddziałów naszego Towarzystwa. Być może również „Listy do biochemików” redagowane przez p. Teresę Wesołowską będą obok wersji drukowanej kolportowane przez naszą listę. Zapraszam także do odwiedzenia strony [www](http://rcin.org.pl) naszego Towarzystwa

Adam Szewczyk

Sekretarz Zarządu Głównego
Polskiego Towarzystwa Biochemicznego