



W dzisiejszych czasach otyłość jest jedną z przyczyn występowania wielu chorób, nawet tych najbardziej tragicznych, prowadzących do śmierci. Szacuje się, że ponad 30% populacji dorosłych Amerykanów, a także prawie 10% populacji zachodniej Europy boryka się z nadwagą. Od wielu lat próbuje się ustalić mechanizmy i przyczyny jej występowania. Wiąże się ją m. in. z niektórymi chorobami takimi jak: cukrzyca, hiperlipidemia czy niektórymi odmianami raka oraz z psychiką osób chorej.

Ważnych informacji dotyczących problemu otyłości dostarczyłaby identyfikacja i lokalizacja genu odpowiedzialnego za otyłość u myszy oraz jego ludzkiego analogu. Próby takiej podjęto się w zespole w Howard Huges Medical School pod kierunkiem J. M. Friedmana. Na podstawie danych uzyskanych z przeprowadzonych badań stwierdzono, że molekularne podstawy patogenezy otyłości nie są znane. Opierając się na teorii Lavoisiera i Laplace'a autorzy stwierdzają, że równowaga pobierania i zużywania energii jest regulowana fizjologicznie. Mechanizmy tej regulacji dyskutowane są już od wielu lat. W badaniach zakłada się, że ośrodkiem mózgowym odpowiedzialnym, za regulację wchłaniania pokarmu i zużycia energii jest *hypothalmus* (VHM). Brak tego ośrodka powoduje zwiększenie pobierania pokarmu jak też spadek zużycia energii. Działania mechanizmu regulatorowego opisane zostały w trzech teoriach: lipostazy, glukostazy oraz wpływu temperatury dla kontroli metabolizmu. Według pier-



wszej, czynnikiem regulującym metabolizm przez interakcję z centralnym układem nerwowym (CUN) są produkty metabolizmu tłuszczów. W drugiej, zasadniczą rolę przypisuje się w regulowaniu zużycia energii poziomowi glukozy w plazmie. W trzeciej, mówi się o znaczeniu temperatury dla kontroli metabolizmu przez CUN. Pierwszym, który zakładał, że funkcję regulatorowa w stosunku do *hypothalmusa* pełni pojedynczy czynnik był Harvey.

Po raz pierwszy recesywną mutację związaną z otyłością u myszy wykryto w 1950 r. Nazwano ją *obese mutation (ob)*. Jest ona związana z cukrzycą II typu. Nie poznano jak do tej pory ani elementu kodującego ani rodzaju uszkodzenia genu. W przeprowadzonych eksperymentach krzyżowych z wykorzystaniem mutantów i szczepu dzikiego, wykazano brak u myszy z mutacją (*ob*) czynnika we krwi odpowiedzialnego za regulację wchłaniania i pokarmu i metabolizmu. Przypuszcza się, że może on być kodowany przez gen, w którym wystąpiła mutacja.

W przeprowadzonych badaniach pod kierownictwem Friedmana wykorzystano dwa transgeniczne szczepy myszy: kongeniczny (C57BL/6J) z 20-krotną nadprodukcją (*ob*)mRNA i koizogeniczny nie syntetyzujący (*ob*)mRNA. W obydwu przypadkach występowały fenotypy charakteryzujące się otyłością. Nie wyjaśniono jeszcze na czym polegają różnice pomiędzy ekspresją (*ob*) u tych mutantów, jak też nie odkryto natury mutacji w szczepie koizogenicznym. Natomiast przeprowadzono m. in. identyfikację, klonowanie i sekwencjonowanie genu, którego uszkodzenie jest związane z otyłością u myszy i jego ludzkiego analogu. Koduje on mRNA zawierający 4500 nukleotydów, o otwartej ramce odczytu dla 167 silnie konserwatywnych aminokwasów. Stopień homologii tego białka u myszy i ludzi wynosi 84%. Ma ono cechy białka sekrecyjnego i jest sygnałem dla ośrodków nerwowych, odpowiedzialnych za regulację metabolizmu.

Prace nad badaniem mutacji w genie otyłości rozpoczęto od jego zmapowania za pomocą metody *restriction fragment length polymorphism (RFLP)*. Wykorzystując technikę *exon trapping* i analizę komputerowych baz danych wyizolowano i zsekwencjonowano gen odpowiedzialny za otyłość myszy. Następnie porównywano z analogicznymi genami u innych kręgowców i wykazano jego znaczną homologię. Świadczyć to może o wysokiej konserwatywności produktu tego genu. Podczas szczegółowego porównywania z genem ludzkim wykazano bardzo wysoką homologię w obrębie sekwencji kodującej, a jedynie 30% podobieństwa w dostępnych sekwencjach niekodujących na 3' i 5' końcu. Sekwencja na N-końcu białka kodowanego przez badany gen u myszy wykazuje mniejsze podobieństwo do ludzkiego odpowiednika niż reszta cząsteczki. Naukowcy z Howard Huges Medical School zakładają, że białkowy produkt tego genu może oddziaływać z CUN przez interakcję z *hypothalmusem*. Może to jednak wymagać istnienia mechanizmu pozwalającego na przejście białka przez barierę krew-mózg. Jednakże czynnik ten może wywoływać reakcję na poziomie tkankowym przez działanie endo-, para- lub autokrynowe. Hipotezy te będą zweryfikowane po stwierdzeniu jego obecności i zlokalizowaniu go w plazmie.

Ciekawe, jak się wydaje, są także prowadzone eksperymenty, w których wykazuje się, że receptor dla białka kodowanego przez gen otyłości jest „za-



pisany" u myszy na genie (*db*) (wiąże się on z powstawaniem cukrzycy). Zweryfikować będzie to można przez klonowanie genu (*db*) lub klonowanie i mapowanie receptora dla białka kodowanego przez gen otyłości.

Problem otyłości zarówno u badanych myszy, jak i u ludzi związany jest nie tylko z fizjologicznymi czynnikami regulacyjnymi, ale z psychiczną sferą życia, np. stresem, znudzeniem. Wydaje się, że na podstawie występowania mutacji (*ob*) u ludzi możemy tylko stwierdzić predyspozycje do bycia otyłym, a nie skazać" kogoś na otyłość.

Maciej Nawrot

Opracowano na podstawie: Zhang Y., Proenca R., Maffel M., Barone M., Leopold L., Friedman J.M., (1994), "Nature", 372, 425-431; Seligmann J., Namuth T., (12 December 1994), "Newsweek".

## Przepływ genów z transgeniczných roślin ziemniaka

Tworzenie roślin transgeniczných daje szansę szybkiego postępu w hodowli nowych odmian, a zarazem wzbudza obawę utraty kontroli nad wprowadzonymi genami i poważnymi skutkami ekologicznymi jakie mogłoby to spowodować, np. nadmiernym rozpowszechnieniem się tak ulepszonych roślin kosztem innych gatunków lub niepożądanym przenoszeniem genów z roślin transgeniczných na pokrewne gatunki. Pyłek roślin, ze względu na swe rozmiary, może być najbardziej skutecznym i najtrudniejszym do kontroli wektorem przenoszącym wklonowane geny.

W sprzyjających warunkach, przenoszenie wklonowanych genów przez pyłek może być znacznie bardziej intensywne i może zachodzić na znacznie większe odległości niż sądzono dotychczas. Transgeniczne rośliny ziemniaka odmiany *Desiree*, zawierające połączone dwa reporterowe geny GUS i NPT II, uprawiano na poletku obrzeżonym roślinami odmiany *Stina*, a dodatkowe poletka tej ostatniej odmiany znajdowały się w odległości 10, 100 i 1000 m od roślin transgeniczných. Rośliny obydwu odmian kwitną w podobnym czasie, a *Stina* wiąże znacznie większą ilość owoców niż inne uprawne ziemniaki.

Obecność genów GUS i NPT II w roślinach wyrosłych z nasion odmiany *Stina* wykrywano za pomocą metody PCR z częstotliwościami: 72, 32, 39, 34, 36 i 31% przy sąsiedowaniu z roślinami transgenicznymi na odległość: 1, 2, 3, 10, 100 i 1000 m. Jeżeli założymy, że w bezpośrednim sąsiedztwie obu odmian, ilości ziarn pyłku obydwu odmian są podobne, a wraz z rosnącą odległością znaczną przewagę ilościową ma pyłek roślin matecznych nad pyłkiem roślin ojcowskich, to uprzywilejowanie pyłku roślin transgeniczných (oj-



cowskich) jest tu bardzo wyraźne. Można to tłumaczyć przeniesieniem pyłku na duże odległości przez żywiące się nim owady słodyszka rzepakowego (*Meligethes aeneus*), większą żywotnością pyłku roślin transgenicznych lub preferencją zapyłania krzyżowego nad samozapyłaniem.

Wyniki tych doświadczeń pokazują, że w pewnych okolicznościach przepływ genów z roślin transgenicznych może mieć masowy charakter i odbywać się na dużym obszarze. Przy polowej uprawie roślin transgenicznych należałoby zwracać uwagę na czynniki ograniczające to zjawisko, np. izolację przestrzenną roślin, dobór odmian produkujących pyłek zdolny do współzawodnictwa z pyłkiem roślin transgenicznych, męską sterylność, niejednakowy czas i intensywność kwitnienia oraz wiązania owoców u roślin uprawianych w pobliżu siebie.

Jerzy Lewosz

Opracowano na podstawie: Theor. Appl. Genet., (1994), 88, 770-774.

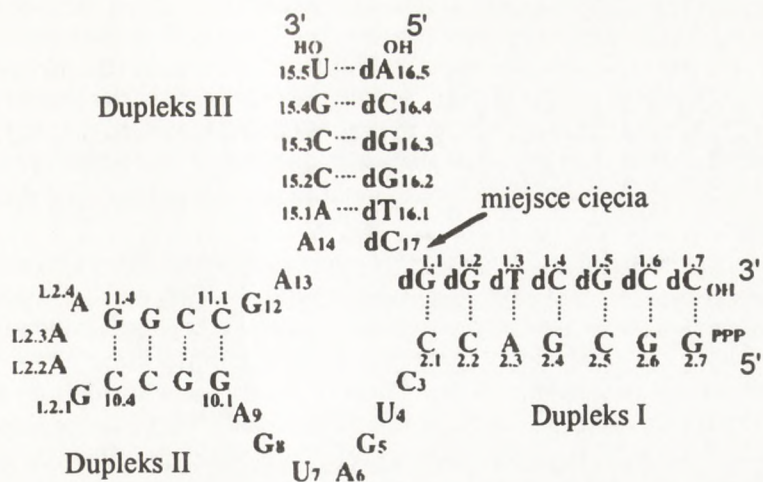
## Struktura rybozomu *hammerhead* rozwiązana?

Od czasu odkrycia w 1982 r. przez T. Cecha i współ. pierwszego RNA o właściwościach katalitycznych, rozpoznano i scharakteryzowano sześć naturalnie występujących klas rybozymów (1). W celu zebrania danych na temat ich struktury drugo- i trzeciorzędowej wykorzystywano liczne metody biochemiczne i fizykochemiczne.

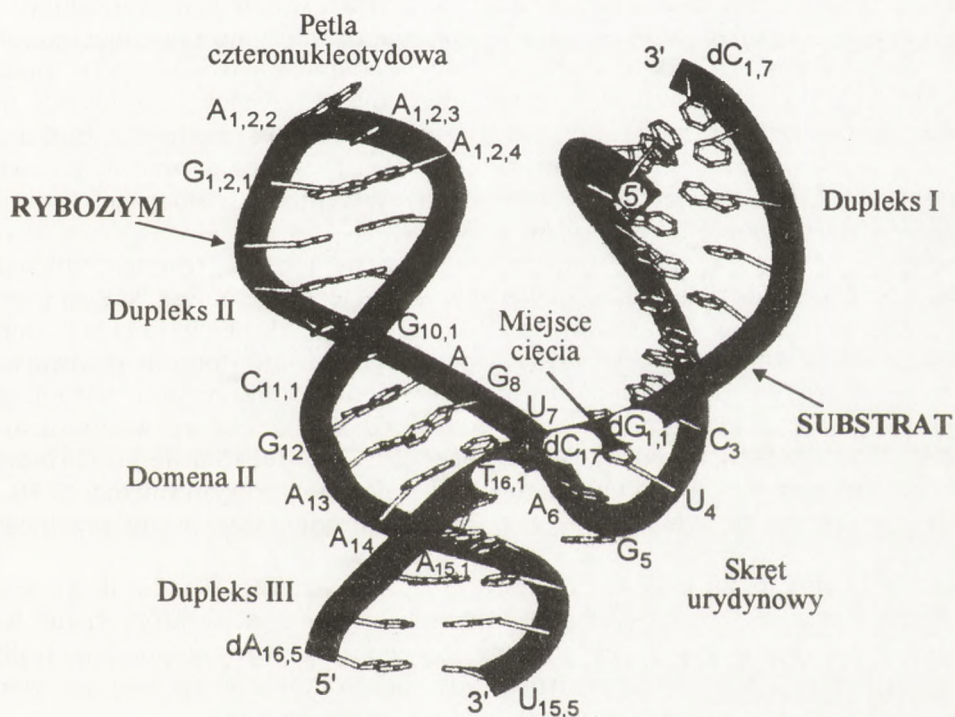
Największe zainteresowanie budzą jednak, występujące w obrębie różnych RNA infekujących rośliny, rybozomy typu *hammerhead*. W związku z małymi rozmiarami i łatwością przystosowania ich do rozcinania dowolnej sekwencji RNA prowadzone są intensywne badania w celu ustalenia ich potencjalnego znaczenia terapeutycznego. Są przesłanki do tego by sądzić, że w postaci metabolicznie stabilnej i łatwo wnikażącej do komórek znajdzie on zastosowanie, jako lek degradujący wirusowe i inne RNA związane z rozwojem choroby (2).

W dotychczasowych badaniach zmierzających do określenia trójwymiarowej struktury rybozomu *hammerhead* grupa amerykańskich badaczy, kierowana przez D.B. McKaya osiągnęła duży sukces (3,4). Opierając się na wynikach analizy rentgenowskiej otrzymanych monokryształów zaproponowali oni model konformacji tego rybozomu i opisali oddziaływania trzeciorzędowe zarówno stabilizujące rdzeń cząsteczki *hammerhead*, jak i umożliwiające jego aktywność katalityczną.

W cząsteczce *hammerhead* można wyróżnić trzy obszary dwuniciowe (dupleksy) połączone z centralnie położonym rdzeniem (rys.1). Wiadomo, że rybozym katalizuje reakcję cięcia wiązania 3',5'-fosfordiestrowego między nu-



Rys.1. Struktura drugorzędowa hammerhead. Numeracja nukleotydów w niciach rybozomu i inhibitora (substratu) wg przyjętej konwencji (4).



Rys. 2. Konformacja rybozomu hammerhead ustalona w wyniku analizy rentgenostrukturalnej (4).



kleotydamy w pozycjach 17 i 1.1 tzw. nici substratowej. W wyniku tej reakcji tworzą się: 1) oligonukleotyd zakończony cyklicznym 2',3'-fosfordiestrem (pozycja nr 17) oraz 2) oligonukleotyd niosący grupę 5'-OH (w pozycji 1.1). Z punktu widzenia mechanizmu reakcji jest to proces transestryfikacji zachodzący tylko w obecności wolnej grupy 2' OH nukleotydu 17. Udowodniono, że substratem dla rybozomu *hammerhead* może być nie tylko nić zbudowana w całości z RNA, ale także nić DNA podstawiona pojedynczym rybonukleotydem w pozycji 17.

Opierając się na tej informacji wymienieni badacze zdecydowali się wykryształizować kompleks rybozomowego RNA z inhibitorową nicią zbudowaną w całości z DNA. Na podstawie otrzymanych wyników krystalograficznych stwierdzili, że struktura cząsteczki *hammerhead* przypomina literę Y — ramionami są dupleksy I i II, a dupleks III położony jest naprzeciwko nich (rys. 2). W obrębie rdzenia wyróżniono dwie domeny. Pierwsza z nich, dotycząca sekwencji (5'-3') C3-U4-G5-A6, obejmuje ostry skręt. Co ciekawe, konformacja tego skrętu jest identyczna z tzw. skrętami urydynowymi („U-turn”), zlokalizowanymi w pętlach antykodonowej i pseudourydynowej tRNA<sup>Phe</sup> z drożdży. Strukturę tę stabilizują wiązania wodorowe. Drugą domenę stanowi nieklasyczny dupleks utworzony przez asocjację trimerów U7-G8-A9 i G12-A13-A14. Domenę tę dodatkowo stabilizują wiązania wodorowe między G8 a G12 oraz G8 a U7. Modyfikacje tych wiązań znacząco obniżają aktywność katalityczną rybozomu.

Aktywność katalityczna rybozomu *hammerhead* zależy od obecności jonów  $Mg^{+2}$  w stężeniach milimolarnych. Na podstawie uzyskanych przez D.B. McKaya i współ. wyników uzyskaliśmy jedynie częściową odpowiedź na pytanie dotyczące lokalizacji jonów magnezu w obrębie tej cząsteczki. Badania krystalograficzne rozmieszczenia jonów  $Cd^{+2}$  i  $Mn^{+2}$ , które w przeciwieństwie do jonów  $Mg^{+2}$ , są widoczne w strukturze kryształu ujawniły miejsce wiązania jonów dwuwartościowych między A9 a G10.1.

Autorzy dyskutują także nad mechanizmem reakcji transestryfikacji. W dotychczasowych badaniach udowodniono, że cięcie nici substratowej przebiega wg mechanizmu nukleofilowego ataku „w linii” (ang. *in-line*) na atom fosforu z udziałem grupy 2'-OH. Cięcie jest katalizowane jonami dwuwartościowymi. Autorzy nie znajdują jonu metalu w centrum aktywnym. Natomiast konformacja nici inhibitora nie pozwala na przebieg cięcia wg mechanizmu „w linii”. Aby wyjaśnić te dylematy autorzy zaproponowali zmianę konformacji linii substratowej — skróconej na wiązaniu fosfordiestrowym między dT16.1 a dC17 — w trakcie wiązania w celu zabezpieczenia właściwego przebiegu reakcji.

Należy jednak podkreślić, że przeprowadzone niezależnie badania konformacji *hammerhead* w roztworze (5), dotyczące cząsteczek, w których nić inhibitora była zbudowana z RNA zawierającego dC17, za pomocą techniki transferu energii przy zastosowaniu metody spektrofluorymetrycznej, potwierdzają ogólny kształt rybozomu przedstawiony przez McKaya.

Mikołaj Olejniczak

**Literatura**

1. Symons R. H., (1994), *Current Opinion in Structural Biology*, 4, 322-330.
2. Cech T. R., Uhlenbeck O. C., (1993), *Nature*, 372, 39-40.
3. Pley H. W., Lindes D. S., DeLuca-Flaherty C., McKay D. B., (1993), *J. Biol. Chem.*, 268, 19656-19658.
4. Pley H. W., Flaherty K. M., McKay D. B., (1994), *Nature*, 372, 68-74.
5. Tuschl T., Gohlke C., Jovin T. M., Westhof E., Eckstein F., (1994), *Science*, 266, 785-789.