

POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE

# POSTĘPY BIOCHEMII

PL ISSN  
0032-5422

## Advances in Biochemistry

TOM 48, NR 1, 2002 . . . . .

Translacja . . . . .	2
Deoksyrybozomy . . . . .	20
Proteoliza białek regulatorowych cyklu	34
Batracylina . . . . .	48
Aktywacja NFκB przez TNF. . . . .	54
Kinazy tyrozynowe . . . . .	66
Fosforylacja tyrozyny u roślin . . . . .	74
Oksydazy polifenolowe roślin wyższych	81

**Szanowni Państwo,**

**Z przyjemnością zawiadamiam, że w dniach od 15 do 18-go września br. w Centrum Konferencyjnym PAN w Wierzbie na Mazurach odbędzie się Międzynarodowe Sympozjum na temat: Sekrecja i glikozylacja białek w drożdżach i grzybach nitkowatych, organizowane przez Centrum Doskonałości Biotechnologii Molekularnej przy Instytucie Biochemii i Biofizyki PAN.**

**W programie sympozjum przewidziano wykłady 15-tu specjalistów, skierowane przede wszystkim do młodych pracowników nauki. Zaplanowano również możliwość prezentacji własnych wyników w formie plakatów.**

**Koszt uczestnictwa 250 Euro oraz 175 Euro dla młodych pracowników naukowych i studentów. Więcej informacji znajdą Państwo na stronie:**

**[www.ibb.waw.pl/Centr-Dosk/wierzba](http://www.ibb.waw.pl/Centr-Dosk/wierzba)**

**Zainteresowanych prosimy o zgłaszanie uczestnictwa i ewentualnych abstraktów i doniesień plakatowych do końca kwietnia br. na adres:**

**Prof. Grażyna Palamarczyk ([gp@ibb.waw.pl](mailto:gp@ibb.waw.pl)) lub  
Agata Stasiak ([cemb@ibb.waw.pl](mailto:cemb@ibb.waw.pl))**

**Adres: Instytut Biochemii i Biofizyki PAN, Pawińskiego 5a, 02-106 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 ŁASKOWSKA  
poniedziałki, czwartki  
monday—thursday  
14—16  
tel. 659-85-71 w. 441  
SKŁAD I ŁAMANIE  
Typesetting  
MAŁGORZATA BASAJ

## RECENZENCI ZESZYTU

Referees of this issue  
JAN BARCISZEWSKI (Poznań)  
NADZIEJA DRELA (Warszawa)  
WITOLD JACHYMCZYK  
(Warszawa)  
TERESA JAKUBOWICZ (Lublin)  
MAŁGORZATA MANTEUFFEL-  
CYMBOROWSKA (Warszawa)  
WOJCIECH RODE (Warszawa)

## ADRES REDAKCJI

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

## SPIS TREŚCI

## CONTENTS

<b>Struktura i funkcja rybosomu prokariotycznego</b> Structure and function of prokaryotic ribosome IZABELA PIOTROWSKA, BEATA DUDZIŃSKA, TOMASZ TWARDOWSKI.	2
<b>Katalityczne DNA – deoksyrybozomy</b> Catalytic DNA – deoxyribozymes BARBARA NAWROT . . . . .	20
<b>Proteoliza białek regulujących przebieg cyklu komórkowego – udział ubikwitynacji</b> Proteolysis of protein cell cycle regulators – involvement of ubiquitination BARBARA GRZELAKOWSKA-SZTABERT . . . . .	34
<b>Batracylina (BAT) – potencjalny lek przeciwnowotworowy</b> Batracynin (BAT) – potential of anticancer drug KRYSTYNA DZIERZBICKA, JAROSŁAW KAWULA, ALEKSANDER M. KOŁODZIEJCZYK . . . . .	48
<b>Mechanizm aktywacji czynnika transkrypcyjnego NFκB przez czynnik martwicy nowotworu (TNF)</b> Mechanism of NFκB activation by tumor necrosis factor (TNF) MAŁGORZATA M. DOSZCZAK, LUCYNA KASZUBOWSKA, ARKADIUSZ PIERZCHAŁSKI, JACEK BIGDA . . . . .	54
<b>Zwierzęce kinazy tyrozynowe</b> Animal protein tyrosine kinases JOANNA TROJANEK . . . . .	66
<b>Roślinne kinazy białkowe fosforylujące tyrozinę</b> Plant protein kinases phosphorylating tyrosine MARIA KLIMECKA, JOANNA TROJANEK, GRAŻYNA MUSZYŃSKA . . . . .	74
<b>Oksydazy polifenolowe roślin wyższych</b> Polyphenol oxidases in higher plants RENATA DĘBOWSKA . . . . .	81
<b>Recenzje książek</b> SŁAWOMIR PIKUŁA . . . . .	92

## Struktura i funkcja rybosomu prokariotycznego

## Structure and function of prokaryotic ribosome

IZABELA PIOTROWSKA<sup>1</sup>, BEATA DUDZIŃSKA<sup>2</sup>, TOMASZ  
TWARDOWSKI<sup>3</sup>

### Spis treści:

- I. Wprowadzenie
- II. Budowa dużej podjednostki rybosomalnej
- III. Budowa małej podjednostki rybosomalnej
- IV. Dynamika oddziaływań między podjednostkami
- V. Mechanizm translacji
- VI. Allosteria rybosomu prokariotycznego
- VII. Podsumowanie

### Contents:

- I. Introduction
- II. Structure of large ribosomal subunit
- III. Structure of small ribosomal subunit
- IV. Dynamic of ribosomal subunits interactions
- V. Mechanism of translation
- VI. Allostery of prokaryotic ribosome
- VII. Conclusion

**Wykaz stosowanych skrótów:** AA-tRNA — aminoacylo-tRNA; D-tRNA — deacylowany tRNA; miejsce A — miejsce wiązania aminoacylo-tRNA; miejsce E — miejsce wiązania deacylowanego tRNA; miejsce P — miejsce wiązania peptydylo-tRNA; P-tRNA — peptydylo-tRNA; PRE — stan pretranslokacyjny rybosomu; POST — stan posttranslokacyjny rybosomu; tRNA — dowolna cząsteczka tRNA bez rozróżniania na formy.

### I. Wprowadzenie

Ostatnim etapem ekspresji informacji genetycznej zakodowanej w DNA jest translacja, czyli przepisanie informacji z mRNA na sekwencję aminokwasową białek. Miejszem biosyntezy białka jest rybosom. Kluczem do wyjaśnienia i zrozumienia mechanizmu działania rybosomu jest poznanie jego struktury.

W ciągu ostatnich dwóch lat opublikowano szereg danych dotyczących struktury i mechanizmu funkcjonowania rybosomu. Dzięki zastosowaniu metod rentgenograficznych w 1999 roku udało się określić

strukturę małej podjednostki rybosomalnej z *Thermus thermophilus* (5.5 Å) [1], funkcjonalnego kompleksu 70S z *T. thermophilus* (7,8 Å) [2] oraz podjednostki 50S z *Haloarcula marismortui* (5 Å) [3]. Rozwiązanie metodami rentgenograficznymi struktury rybosomu z *T. thermophilus* [2] w znacznym stopniu przyczyniło się do określenia miejsca i zasięgu oddziaływań pomiędzy podjednostkami tworzącymi funkcjonalny kompleks 70S. Zostały one opisane w naszym poprzednim artykule w *Postęпах Biochemii* [4].

Dokładniejsze określenie struktury i oddziaływania poszczególnych komponentów podjednostek stało się możliwe w konsekwencji analiz rentgenograficznych dokonanych z rozdzielczością 2,4 Å dla dużej podjednostki *H. marismortui* w roku 2000 [5] i 3,3 Å dla małej podjednostki *T. thermophilus* [6]. Wykorzystanie mikroskopii krioelektronowej w badaniach struktury rybosomu 70S *Escherichia coli* [7] dostarczyło danych dotyczących oddziaływań między podjednostkami. Technika ta pozwoliła również na określenie zmian konformacyjnych rybosomu podczas kolejnych etapów procesu biosyntezy białka [8].

Poznanie struktury podjednostek 50S i 30S, omówione w rozdziałach II-IV, umożliwia przeprowadzenie dyskusji nad budową i mechanizmem aktyw-

<sup>1</sup>Mgr, <sup>2</sup>mgr, <sup>3</sup>prof. dr hab; Instytut Chemii Bioorganicznej PAN, ul. Noskowskiego 12/14, 61-704 Poznań

ności biologicznej rybosomu prokariotycznego (rozdziały V i VI).

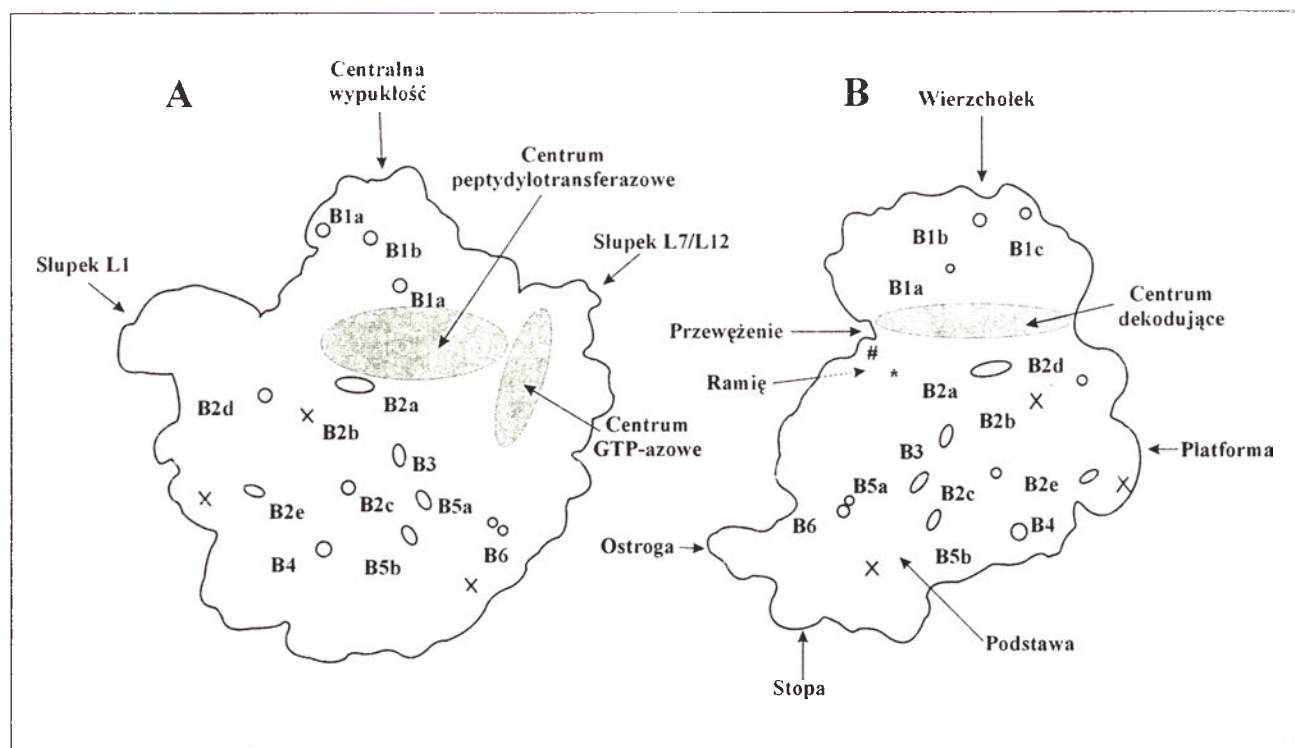
## II. Budowa dużej podjednostki rybosomalnej

W 2000 roku udało się ustalić metodami rentgenograficznymi strukturę dużej (50S) podjednostki rybosomalnej z *Haloarcula marismortui* przy rozdzielczości 2,4 Å [5]. Zawiera ona dwie cząsteczki RNA, 23S rRNA (2923 nukleotydy) i 5S rRNA (122 nukleotydy) oraz 31 białek. Podjednostka ta ma około 250 Å średnicy i składa się z podstawy oraz trzech wypukłości: słupka L1, centralnej wypukłości oraz słupka L7/L12 (Ryc. 1). Powierzchnia oddziałująca z podjednostką 30S jest spłaszczona poza głęboką szczeliną przebiegającą przez całą szerokość podjednostki 50S. Szczelina miejsca aktywnego ma wystarczający rozmiar by pomieścić 3' końce cząsteczek tRNA i jest miejscem tworzenia wiązania peptydowego [9]. Od środka szczeliny odchodzi tunel o długości około 100 Å i szerokości 15 Å. Przez tunel ten przechodzi nowo syntetyzowany łańcuch polipeptydowy.

W strukturze drugorzędowej dużej cząsteczki rybosomalnego RNA wyróżnić można 101 helis (H1-H101) tworzących sześć domen (I-VI) [5]. Szczegółowy opis struktury i funkcji tych domen zamieszczono w Tabeli 1 i na Rycinie 2. Skomplikowa-

na struktura przestrzenna 23S rRNA jest spowodowana występowaniem szeregu znanych motywów oddziaływań trzeciorzędowych jak: suwak rybozowy, pseudowęzły, czteronukleotydytowe pętle, pary trójek zasad. Motyw suwaka rybozowego występuje m.in. w miejscu wiązania białka L11 [10], zapewniając ściśle upakowanie helis 23S rRNA w tym regionie.

Szczelina miejsca aktywnego, w obrębie której znajduje się centrum peptydylotransferazowe oraz płaska powierzchnia podjednostki 50S, oddziałująca z małą podjednostką, utworzone są głównie z rRNA i są prawie pozbawione białek [5]. W tych obszarach dużej podjednostki występują wysoce konserwatywne sekwencje 23S rRNA, co świadczy o ich zasadniczej funkcji w procesie translacji. Można sądzić, że białka odgrywają stabilizującą rolę, utrzymując odpowiednią strukturę trzeciorzędową domeny V 23S rRNA, warunkującą jej aktywność. Całkowite odbiałczenie dużej podjednostki niszczy jej zdolność syntezy wiązania peptydowego [11]. Równie wysokim konserwatyżmem sekwencji nukleotydowej jak centrum peptydylotransferazowe charakteryzuje się fragment sekwencji 23S rRNA, odpowiedzialny za wiązanie czynników elongacyjnych, tzw. domena  $\alpha$ -sarcyny [12, 13]. Przecięcie tylko jednego wiązania fosfodiesterowego w jej obrębie prowadzi do całkowitej utraty aktywności rybosomu [14].



Ryc. 1. Schemat podjednostek rybosomu 70S, na podstawie [2,7]. Szczegółowy opis przedstawionych mostków łączących podjednostki zamieszczono w tabeli 3 (Tab. 3). A — podjednostka 50S z wyróżnionymi elementami strukturalnymi, B — podjednostka 30S z wyróżnionymi elementami strukturalnymi, O — miejsca oddziaływań między podjednostkami, na podstawie [7], X — wskazuje blisko położone regiony podjednostek, nie tworzące jednak mostków, \*,# — wskazuje miejsca kontaktu ramienia z wierzchołkiem podjednostki 30S, na podstawie [7].

**Tabela 1**

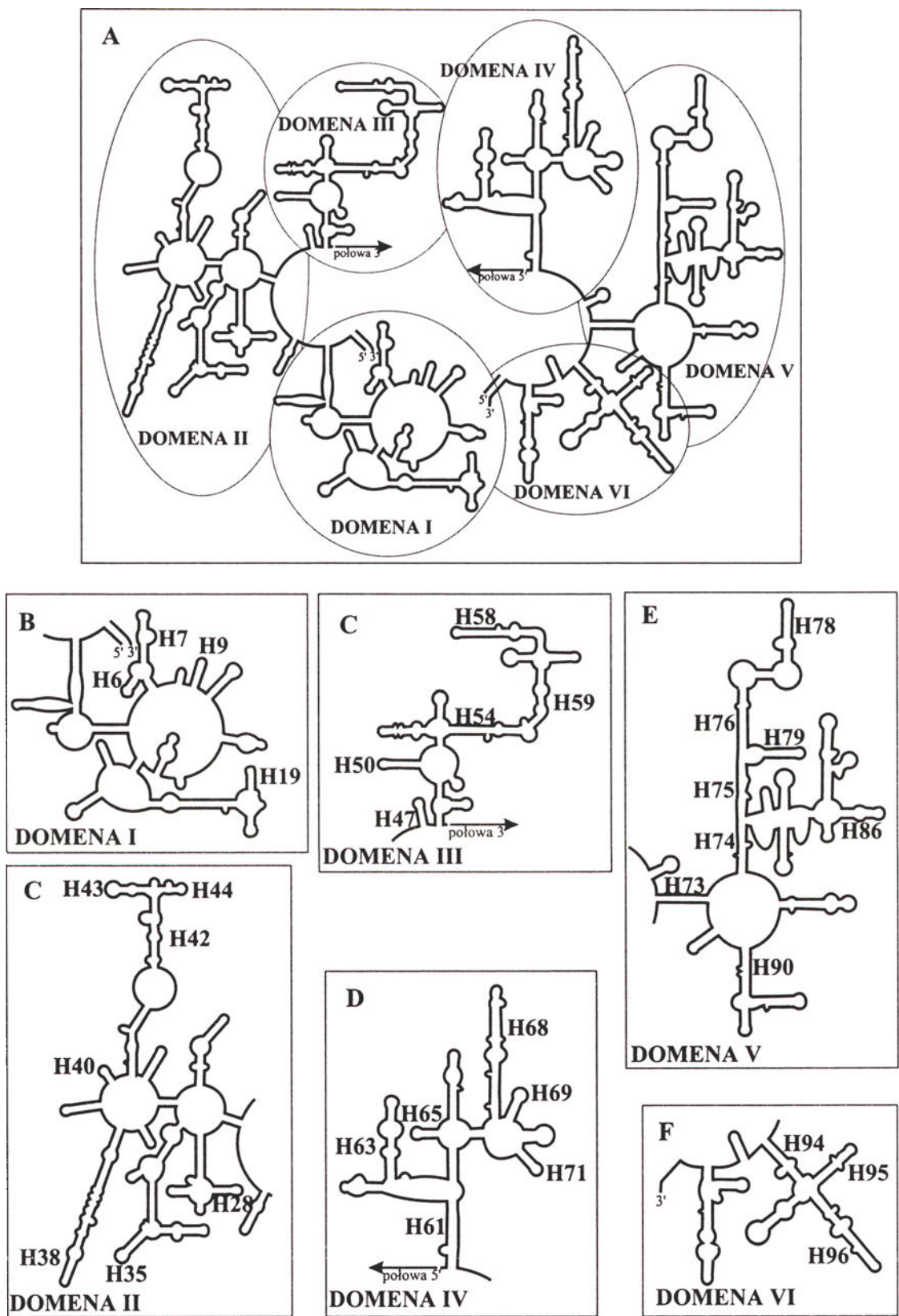
Struktura i funkcja 23S rRNA, na podstawie [2, 5, 7, 9, 51]. Graficzne przedstawienie struktury drugorzędowej 23S rRNA z wyróżnieniem poszczególnych domen zawiera rycina 2 (Ryc. 2).

DOMENA 23S rRNA	POŁOŻENIE	STRUKTURA I FUNKCJA	RYC.
I	Leży z tyłu podjednostki 50S, w pobliżu słupka L1 Zawiera helisy H1-H24.	H7 tworzy ścianę tunelu wyjścia syntetyzowanego polipeptydu H6 i H9 są miejscem wiązania białka L23 H19 wiąże białko L4 (wraz z H28 domeny II 23S rRNA)	2A,2B
II	Największa z domen 23S rRNA Podział na dwie subdomeny: IIa zawiera helisy H26-H36 i H46 IIb obejmującą helisy H37-H45.	H28 wiąże białko L4 H32-H35a tworzą mostek z podjednostką 30S H35-H37 budują ścianę tunelu wyjścia H38 tworzy mostek B1a (wcześniej nazywanym palcem miejsca A) H38, H39 i H41 oddziałują z 5S rRNA H38 może oddziaływać z AA-tRNA związanym w miejscu A H42-H43 są miejscem wiązania białka L11 H42-H44 są miejscem oddziaływania EF-tu i EF-G i tworzą niebiałkową część słupka L7/L12 H42-H44 są miejscem wiązania białka L1 H43 jest miejscem oddziaływania czynnika elongacyjnego EF-G oraz tio-streptonu	2A,2C
III	Zawiera helisy H47-H60	Ma zwartą globularną strukturę W odróżnieniu od pozostałych domen tylko w niewielkim stopniu oddziałuje z domeną V 23S rRNA H51-H54 prawdopodobnie jest miejscem wiązania białka L23 H49-H51 i H59 budują ścianę tunelu wyjścia polipeptydu	2A,2D
IV	Występuje najbliżej powierzchni dużej podjednostki oddziałującej z podjednostką 30S, Zawiera helisy H61-H71	H65 tworzy ścianę tunelu wyjścia H67-H71 tworzą obręcz szczeliny miejsca aktywnego H66-H67 wiążą białko L2 H63 tworzy mostek B6 H68 i H71 tworzą mostki B2b, B2c, B2d, B2e H69 tworzy mostek B4 i B2a	2A,2E
V	Leży pośrodku podjednostki: tworzy dużą część centralnej wypukłości Obejmuje helisy H72-H93	Centralna pętla domeny zaangażowana jest w aktywność peptydylotransferazową H89-H93 stabilizują sekwencje centrum GTP-azowego w domenie VI 23S rRNA H73 oddziałuje z H94 domeny VI 23S rRNA H75-H79 są prawdopodobnie miejscem wiązania białka L9 H76 wiąże białko L1 H77 i H88 tworzą miejsce E wiązania D-tRNA H80 (G2251 i G2252) są miejscem wiązania nukleotydów C74 i C75 peptydylotRNA w miejscu P (na powierzchni szczeliny miejsca aktywnego oddziaływania) H92 (G2553) miejsce wiązania końca 3' AA-tRNA w miejscu A	2A,2F
VI	Tworzy część powierzchni podjednostki 50S poniżej słupka L7/L12 Zawiera helisy H94-H101	Pętla $\alpha$ -sarcyny (H95) odpowiedzialna jest za wiązanie czynników elongacyjnych (EF-Tu, EF-G) H94 oddziałuje z domeną I 23S rRNA	2A,2G

5S rRNA składa się z około 120 nukleotydów; w komórkach *H. marismortui* zbudowany jest ze 122 nukleotydów. Strukturę bakteryjnego 5S rRNA tworzy pięć helis: helisa H1, ramię zawierające helisy H2 i H3 z pętlami B i C oraz ramię utworzone przez helisy H4 i H5 z pętlami D i E [5]. W odróżnieniu od struktury krystalicznej syntetycznego 5S rRNA, o sekwencji identycznej z 5S rRNA *E. coli*, gdzie heli-

sy H2 i H3 oddziałują z H4 i H5 [15](Ryc.3A), cząsteczka uwidoczniiona przy rozdzielczości 2,4 Å ma strukturę rozciągniętą (Ryc.3B). Taka konformacja jest wynikiem skrócenia pętli A, w obrębie której występują oddziaływania niekanoniczne.

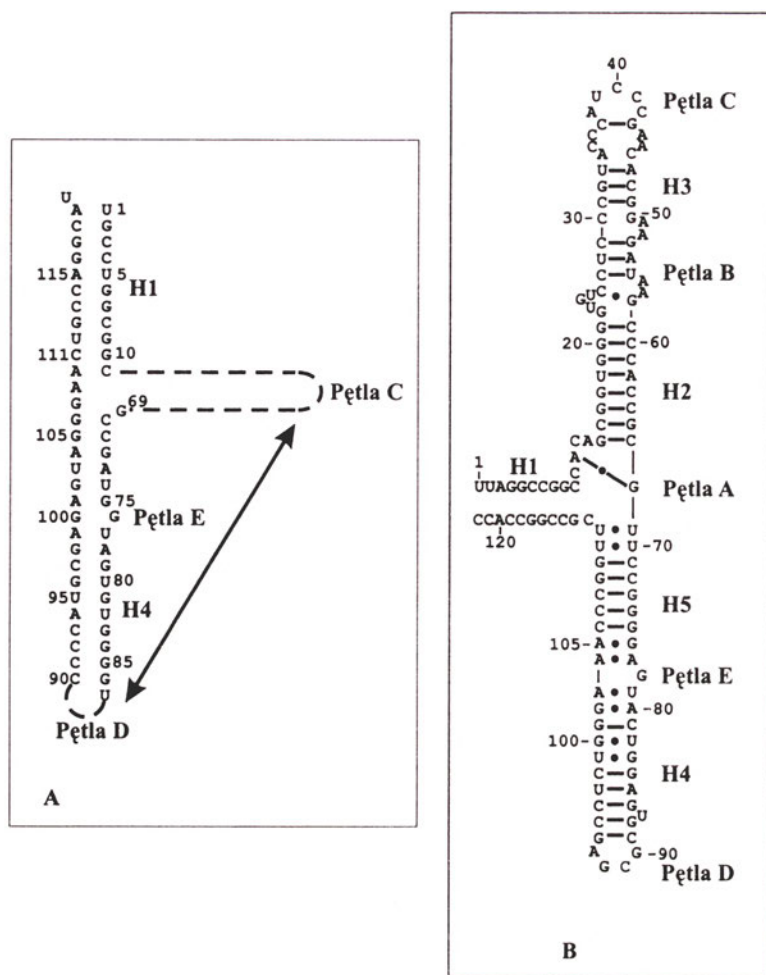
Cząsteczka 5S rRNA oddziałuje z kilkoma białkami dużej podjednostki. W przypadku *E. coli* cząsteczka ta oddziałuje z trzema białkami podjed-



Ryc. 2. Struktura drugorzędowa 23S rRNA, na podstawie [5]. A — zaznaczone są fragmenty dyskutowane w tekście; rysunki B, C, D, E, F, G korelują z zaciemnionymi obszarami. Charakterystykę przedstawionych domen zamieszczono w tabeli 1 (Tab.1).

nostki 50S: L5, L25 oraz L18 [15]. Odmienne interakcje zaobserwowano natomiast w strukturze rozwiązanej przy rozdzielczości 2,4 Å u *H. Marismortui* [5]. Zgodnie z tymi danymi 5S rRNA oddziałuje z L10, L30, L18, L5, L21e (litera „e” przy nazwie ma na celu odróżnienie białek dużej podjednostki *H. marismortui*, dla których znaleziono dotychczas tylko

homologi eukariotyczne, od białek występujących u eubakterii, a które mogą mieć to samo oznaczenie). Interesujący jest fakt, że białka te jednocześnie oddziałują z domenami 23S rRNA, zapewniając w ten sposób kontakt między dwoma cząsteczkami kwasu rybonukleinowego dużej podjednostki. O ile oddziaływanie za pośrednictwem białek między 5S rRNA a



Ryc. 3. Struktura drugorzędowa 5S rRNA. A — struktura 5S rRNA *E. coli*, na podstawie [15], B — struktura 5S rRNA *H. marismortui*, na podstawie [5].

23S rRNA są dosyć liczne, bezpośredni kontakt między tymi molekułami kwasów nukleinowych wydaje się ograniczać do jednego regionu: H4 i H5 5S rRNA i najdłuższej nierozgałęzionej helisy 23S rRNA (H38). Nie potwierdzają tego badania biochemiczne, według których H38 23S rRNA oddziałuje z H2 i H3 5S rRNA [16] a H4 i H5 5S rRNA tworzy dodatkowe oddziaływanie z domeną II 23S rRNA (H39 i H41) jak i z jego domeną V [17].

Podjednostka 50S organizmów prokariotycznych zbudowana jest zasadniczo z 34 białek, jednakże według badań N. Ban'a duża podjednostka rybosomalna *H. marismortui* składa się z 31 białek [5]. W strukturze krystalicznej nie udało się uwidocznić białek L1, L10, L11, L12. Nie jest to wynikiem zbyt niskiej rozdzielczości, lecz elastyczności struktur utworzonych przez te białka (uwidocznionych m.in. dzięki mikroskopii krioelektronowej) [8]. Za wyjątkiem białek L1, L7, L10, L11, białka nie wystają poza szkielet utworzony przez cząsteczki rRNA. Spośród 30 znanych obecnie struktur krystalicznych izolowanych białek (nadal nieznana jest struktura białka L10), 17 ma strukturę globularną, a pozostałe 13 zawiera zarówno domeny globularne jak i rozciągnięte (ang. *extended*) lub całkowicie

przyjmuje strukturę liniową (Tab.2). Takie rozciągnięte, liniowe domeny często nie mają oczywistej struktury trzeciorzędowej. Większość globularnych domen występuje w zewnętrznych częściach podjednostki, w szczelinach utworzonych przez rRNA. Rozkład białek na powierzchni podjednostki jest prawie równomierny, poza szczeliną miejsca aktywnego oraz płaską powierzchnią oddziałującą z podjednostką 30S. Wnętrze dużej podjednostki nie jest jednak pozbawione białek, lecz występują tam rozciągnięte domeny białek odchodzące od globularnych części z powierzchni podjednostki. Te rozciągnięte struktury penetrują wewnątrz, wypełniając przestrzeń między sąsiadującymi elementami rRNA. Nietypowa struktura białek może być wytłumaczona ich oddziaływaniem z rRNA. Jednym z białek o strukturze globularno-liniowej jest L4 [18], które wraz czterema innymi białkami L13, L20, L22, L24 konieczne jest do utworzenia pierwotnej struktury trzeciorzędowej 23S rRNA u *E. coli* [18]. Przykładem drugiego białka o takiej strukturze jest białko L2, które jest największym białkiem dużej podjednostki rybosomalnej (w małej podjednostce największe jest białko S1) [19]. Białko L2 wchodzi w skład centrum peptydylotransferazowego. W ko-



Tabela 2

Konformacja i oddziaływanie białek dużej podjednostki *H. marismortui*, na podstawie [5].

	Białko	Konformacja	Oddziaływania								
			Domeny 23S rRNA						5S rRNA	Białka	
			I	II	III	IV	V	VI			
A	L1	lin.						+			
	L2	glob + lin.		+	+	+	+				L37ae
	L3	glob + lin.		+/-		+	+	+			L14,L24e,L13+/-
	L4	glob + lin.	+	+			+/-				L18e+/-,L24+/-,L37e
	L5	glob.					+		+		L18
	L6	glob.		+/-			+/-	+			L13+/-
	L10	glob. ?		+							L12
	L11	glob.		+							
	L12	glob.									L10
	L13	glob.		+			+/-	+/-			L3+/-,L6+/-
	L14	glob.				+	+	+			L3,L24e
	L15	glob + lin.	+	+			+				L18e+/-,L32e+/-
	L18	glob + lin.		+/-			+		+		L5,L21e
	L19	glob + lin.		+	+	+		+/-			
	L22	glob + lin.	+	+/-	+	+	+	+			
	L23	glob	+/-		+						L29,L39e+/-
L24	glob + lin.	+								L4+/-	
L29	glob	+								L23	
L30	glob		+						+		
B	L18e	glob		+							L4+/-,L15+/-
	L21e	glob		+				+		+/-	L18
	L24e	glob				+/-			+		L3,L14
	L31e	glob			+				+		
	L32e	glob	+/-	+							L15+/-
	L37e	glob + lin.	+	+	+	+/-					L4+/-
	L39e	lin.	+		+						L23+/-
	L44e	glob + lin.	+			+/-					L15e+/-
L7ae	glob	+/-								L15e	
C	L10e	glob		+				+		+/-	
	L15e	glob + lin.	+	+/-	+/-	+/-	+				L44e+/-,L7ae
	L37ae	glob + lin.		+	+	+					L2

mórkach *E. coli* L2 bierze udział w tworzeniu mostka B2e pomiędzy podjednostkami [3]; wykazano również jego niezwykle silne oddziaływanie zarówno z 16S rRNA jak i białkiem S11 małej podjednostki [7]; białko S11 prawdopodobnie uczestniczy w selekcji AA-tRNA [20].

W analizie struktury podjednostki 50S przy rozdzielczości 2,4 Å [5] okazało się, że białko L22 jako jedyne ma kontakt ze wszystkimi sześcioma domenami 23S rRNA. U *H. marismortui* białko to zlokalizowano przy końcu tunelu wyjścia syntetyzowanego polipeptydu [9]. Białko L22 wydaje się szczególnie ważne dla prawidłowego funkcjonowania rybosomu bakteryjnego, ponieważ delecja trzech aminokwasów (82-84) występujących w strukturze szpilki powoduje oporność na erytromycynę — antybiotyk hamujący elongację łańcucha peptydowego. Podobny

efekt powodują mutacje w domenach II i V 23S rRNA, w miejscach wiązania białka L22 [21].

Za wyjątkiem białka L12 wszystkie pozostałe białka oddziałują bezpośrednio z rRNA [5]. Istnieje siedem białek oddziałujących tylko z jedną domeną 23S rRNA (Tab. 2). Trzy spośród nich (L24, L29, L18) oddziałują z kilkoma elementami struktury drugorzędowej w obrębie domen 23S rRNA (L24 i L29 z domeną I, L18 z domeną V, chociaż możliwe jest słabe oddziaływanie tego białka z domeną II 23S rRNA) stabilizując w ten sposób ich układ przestrzenny. Trzy kolejne białka (L10 i L11 oddziałujące z domeną II a L1 z domeną V 23S rRNA) bezpośrednio uczestniczą w procesie biosyntezy białka. W ich przypadku wydaje się, że to struktura 23S rRNA stanowi szkielet dla odpowiedniego umiejscowienia tych białek w podjednostce. Ostat-

nim białkiem oddziałującym tylko z jedną domeną 23S rRNA jest białko L7ae (ae przy nazwie wskazuje rybosomalne białka archebakteryjne, znalezione u *H. marismortui*, posiadające również homologi eukariotyczne, w celu odróżnienia od białek występujących u eubakterii, a które mogą mieć tę samą nazwę), słabo oddziałujące z domeną I, z tego względu nie może ono raczej spełniać roli stabilizującej rRNA. Białko L7ae występuje też w znacznej odległości zarówno od centrum peptydylotransferazowego jak i od miejsca wiązania czynników elongacyjnych, jednak zlokalizowano je w pobliżu białka L1, które jest zaangażowane w funkcjonowanie miejsca E (tzw. miejsce wyjścia — miejsce wiązania deacylowanego tRNA po zsyntetyzowaniu wiązania peptydowego). L7ae może też brać udział w formowaniu kompleksu funkcjonalnego 70S z podjednostek, gdyż wcześniej u *H. marismortui* przypisano to białko jako składnik małej podjednostki (HMS 7) [5].

W podjednostce 50S tej halofilnej archebakterii brak jest homologów białek L25 (oddziałującego u *E. coli* z 5S rRNA [15]) oraz L9, które u *E. coli* wiąże się do V domeny 23S rRNA pomiędzy miejscem wiązania białka L1 a pętlą P (jako pętlę P określa się sekwencję, z którą oddziałuje koniec 3' peptydylotRNA w miejscu P podjednostki 50S) [22]. Istnieje możliwość, iż obecność białka L9 w dużej podjednostce jest cechą charakterystyczną dla eubakterii.

W centrum peptydylotransferazowym oprócz domeny V 23S rRNA występują białka L2, L3, L4 i L10 [9]. Wśród nich nieznana jest tylko struktura białka L10. Pozostałe trzy zawierają zarówno domeny globularne jak i rozciągnięte. Białka L2, L3 i L4 oddziałują z domeną V jak i II 23S rRNA, podczas gdy białko L10 wiąże się tylko do domeny II 23S rRNA. Umieszczenie białek L2 i L3 w pobliżu centralnej pętli domeny V 23S rRNA sugerowało ich udział w tworzeniu wiązania peptydowego. Jednak wyniki najnowszych badań wykazały, że za aktywność katalityczną najprawdopodobniej odpowiada tylko rRNA [9], a nie białka oddziałujące z tą domeną. Białka utrzymują jednak odpowiednią strukturę trzeciorzędową domeny V, warunkującą jej aktywność, ponieważ całkowite odbiałczenie dużej podjednostki niszczy jej zdolność syntezy wiązania peptydowego [11].

W dużej podjednostce znajduje się również centrum GTP-azowe [3] składające się z białek L6, L11, L14 i tetrameru L7/L12 oraz dwóch sekwencji 23S rRNA, tj. domeny  $\alpha$ -sarcyny i nukleotydów 1055-1080. To centrum podjednostki 50S odpowiedzialne jest za wiązanie czynników elongacyjnych

(EF-G, EF-Tu), a także czynnika inicjującego IF-2 i czynnika uwalniającego RF3. Nukleotydy w obrębie sekwencji 1055-1080 są miejscem oddziaływania tiostreptonu [23], antybiotyku wiążącego się nieodwracalnie do rRNA w tym regionie i hamującego hydrolizę GTP związanego z EF-G. Obecność białka L11 wzmacnia wiązanie tiostreptonu od 100 do 1000 razy, ale ta stymulacja uzależniona jest od obecności N-końca tego białka. Zaproponowano, że część ta funkcjonuje jako przełącznik, odwracalnie oddziałujący z przyległymi rejonami rRNA, podczas gdy domeny C-końca białka L11 ściśle wiążą się do 23S rRNA [10]. Białko L11 oddziałuje z 23S rRNA tworząc tzw. motyw suwaka rybozowego (ang. *ribose zipper*), występującego również w domenie P4-P6 I grupy intronów. Homologi L11 znaleziono u wszystkich organizmów i jest ono „wymienne” między eubakteriami, archebakteriami jak i eukariotami [24]. Termin „wymienne” oznacza w tym przypadku możliwości przenoszenia tego konkretnego białka pomiędzy rybosomami izolowanymi z różnych królestw.

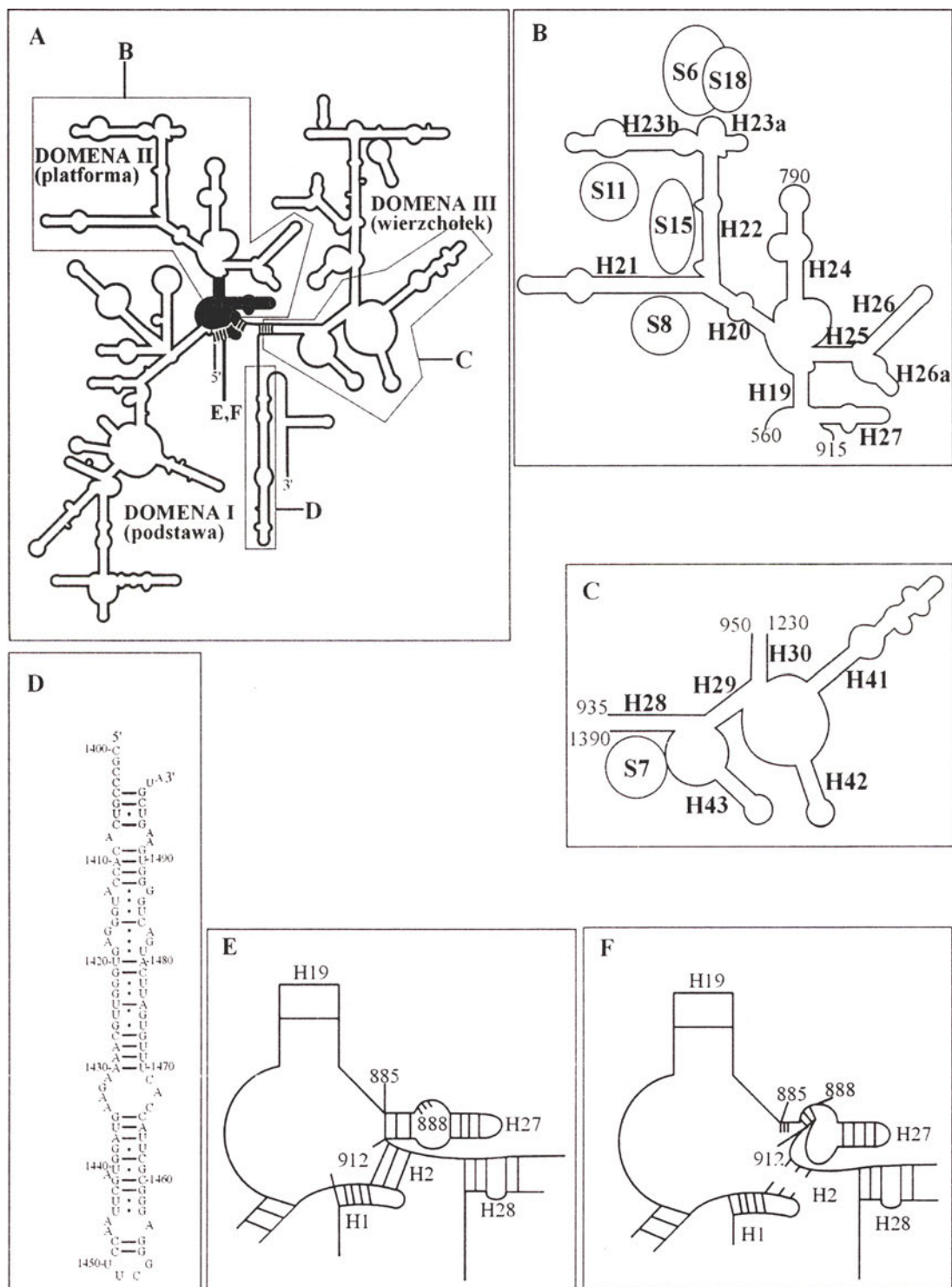
Wchodząca w skład centrum GTP-azowego domena  $\alpha$ -sarcyny należy do najintensywniej analizowanych struktur LrRNA [25-27]. Według badań biochemicznych [28] jest miejscem wiązania białek L3 i L6. Badania krystalograficzne [3,7] nie potwierdzają oddziaływania z białkiem L3 natomiast w izolowanej podjednostce 50S u *H. marismortui* [5] oddziaływanie to określono jako silne. Interesujące jest, że mutacja białka L3 występującego w sąsiedztwie zarówno centrum peptydylotransferazowego jak i pętli  $\alpha$ -sarcyny powoduje zmianę wierności translacji [29], co może świadczyć o zaangażowaniu tego białka w kontrolowaniu ramki odczytu mRNA. Od strony głębokiej bruzdy domena  $\alpha$ -sarcyny oddziałuje z białkiem L6 [7], natomiast z drugiej strony otoczona jest przez L14, które jednak nie jest w bezpośrednim kontakcie z domeną.

Jedynymi białkami występującymi w więcej niż jednej kopii w podjednostce, jest kompleks białek L7/L12 tworzących tetramer. Wraz z białkiem L10 tworzą tzw. kompleks L8 [30]. Białko L7 różni się od L12 tylko acylowanym N-końcem. Każde z białek tetrameru składa się z trzech domen. N-końcowa domena odpowiedzialna jest za zakotwiczenie do rybosomu poprzez wiązanie z białkiem L10, podczas gdy koniec C zaangażowany jest w wiązanie czynników elongacyjnych. Słupek L7/L12 jest strukturą elastyczną, która w zależności od miejsca wiązania tRNA: aminoacylo-tRNA (AA-tRNA) w miejscu A, peptydylotRNA (P-tRNA) w miejscu P, deacylowanego tRNA (D-tRNA) w miejscu E i stanu rybosomu:

pre- lub posttranslokacyjnego przyjmuje różne konformacje [8]. Związanie do podjednostki 50S ligandów, takich jak czynnik elongacyjny EF-G lub AA-tRNA powoduje przyjęcie dobrze rozwiniętej struktury przez ten słupek (porównaj rozdziały V i VI). Równie elastyczną strukturą jest słupek L1. Mogło to być przyczyną ich niewykrycia na mapie gęstości elektronowej *H. marismortui* [5].

### III. Budowa małej podjednostki rybosomalnej

W 2000 roku udało się uzyskać również strukturę krystaliczną małej podjednostki rybosomalnej z *Thermus thermophilus* przy rozdzielczości 3,3 Å [6]. Zbudowana jest ona z 19 białek oraz cząsteczki 16S rRNA (Ryc. 4A). Uwidocznione cechy morfologicz-



Ryc. 4. Struktura drugorzędowa 16S rRNA, na podstawie [1, 2, 31, 34, 35]. A — zaznaczone są fragmenty struktury dyskutowane w tekście; rysunki B, C, D korelują z odpowiednimi zaciemnionymi obszarami, rysunki E i F korelują z miejscem zaznaczonym kolorem czarnym, B — centralna domena 16S rRNA, C — obszar oddziaływania 16S rRNA z białkiem S7, D — przedostatnia helisa (H44) 16S rRNA, zaciemniony obszar wskazuje na miejsce wiązania AA-tRNA i P-tRNA, E — opisany w tekście schemat tworzenia par zasad 912-885 w cząsteczce 16S rRNA, F — opisany w tekście schemat tworzenia par zasad 912-888 w cząsteczce 16S rRNA.

ne podjednostki 30S pokrywają się z wcześniej uzyskanymi wynikami [1, 2, 4, 6, 7]. Wyróżnić można wierzchołek z nosem, przewężenie, podstawę, platformę i ramię oraz stopę z palcem nazywanym również ostrogą (Ryc. 1B). Powierzchnia podjednostki stanowi najważniejszą funkcjonalnie część i utworzona jest głównie z helikalnych nici 16S rRNA tworzących szkielet podstawy, ramienia i platformy [7]. Białka małej podjednostki wydają się pełnić rolę stabilizującą odpowiednią konformację 16S rRNA, chociaż nie można wykluczyć udziału kilku białek w bezpośrednim zaangażowaniu w procesie biosyntezy [1].

Pionowo, wzdłuż długiej osi podjednostki 30S rozciągają się helisy H7, H44 oraz H16/H17 16S rRNA [6]. Helisy H44 i H16/H17 leżą na płaskiej powierzchni oddziałującej z dużą podjednostką. Te pionowe helisy połączone są ze sobą krótszymi odcinkami helikalnymi, wśród których ważną funkcję pełni helisy H21-H23 (Ryc. 4B), rozciągające się od ramienia do platformy podjednostki.

Cząsteczkę 16S rRNA można podzielić na trzy strukturalne domeny: domenę 3', domenę centralną i domenę 5' [31]. Każda z tych domen wraz z zasocjowanymi białkami może być rozpatrywana jako oddzielny kompleks rybonukleoproteinowy tworzący odpowiednio podstawę, platformę i wierzchołek małej podjednostki (Ryc. 4A). Białka S6, S8, S11, S15, S18, S21 (70kDa) wraz z centralną domeną 16S rRNA tworzą platformę (Ryc. 4A, 4B). Wchodzące w skład kompleksu białko S11 uczestniczy w selekcji tRNA [20], wykazano też możliwość jego oddziaływania z białkiem L2 dużej podjednostki w funkcjonalnym kompleksie 70S [7]. Białko S8 wiąże się do helisy H21 [32] i wraz z białkami S4 i S5 (które prawdopodobnie oddziałują z mRNA) tworzy połączenie platformy z ramieniem [6]. Mutacje białek S4 i S5 powodują błędy odczytu mRNA, co wskazuje na możliwość ich zaangażowania w kierowanie procesem translacji [33]. Tworząca platformę niższa część centralnej domeny 16S rRNA utworzona jest z połączenia trzech helis (H20, H21, H22), wyższa część zawiera helisy H23a, H23b (Rys. 4B) i jest miejscem wiązania białek S6 i S18 [34]. Białko S6 oddziałuje z mniejszą bruzdą 16S rRNA w miejscu połączenia helisy H22 z H23b, a białko S18 wiąże się z S6 i oddziałuje z 16S rRNA w obrębie jednoniciowych odcinków helisy H23a. Do ich przyłączenia jest jednak wymagane wcześniejsze związanie białka S15 z wyższą częścią centralnej domeny 16S rRNA. Białko S15 oddziałuje z pętlą GAAG helisy H23a oraz z mniejszą bruzdą H22, stabilizując w ten sposób strukturę rdzenia centralnej

domeny, jednocześnie tworzy ono mostek B4 z helisą H69 23S rRNA [7]. Przód i tył platformy wykazują pewną elastyczność względem siebie [1]. Ta część podjednostki przyczynia się do wiązania P-tRNA w miejscu P i po asocjacji z dużą podjednostką zmienia swoją konformację [35]. W wyższej części platformy znajduje się omówiona w dalszej części rozdziału sekwencja anty-Shine-Dalgarno.

Wierzchołek podjednostki 30S składa się głównie z 3'końca 16S rRNA (oprócz dwóch ostatnich helis H44 i H45) [6] i jest miejscem oddziaływania mRNA, cząsteczek AA-tRNA, P-tRNA i D-tRNA oraz czynnika elongacyjnego EF-G [36]. Zgrupowanie białek w obrębie wierzchołka stabilizuje trzeciorzędową strukturę 16S rRNA złożonego z krótkich helis i kilku wielohelisowych połączeń o skomplikowanej architekturze [6]. Najwyższa część wierzchołka utworzona jest przez helisy H41 i H42 (Ryc. 4C). Struktura określana jako nos złożona jest z helis H33 i H33a. Upakowane razem helisy H35/H36/H38/H39 leżą po przeciwnej stronie wierzchołka. Helisy H29, H30, H32 owijające się wokół wierzchołka tworzą owalną „kieszę” dla białek. Połączenie pętli helis H28, H29 i H43 stanowi miejsce wiązania białka S7. Struktura krystaliczna małej podjednostki [6] wykazała, że białko S7 leży w pobliżu miejsc P i E i możliwe jest jego zaangażowanie w wiązanie P-tRNA oraz D-tRNA [37]. Białko S7 wydaje się wpływać na stabilność struktury 16S rRNA w obrębie całego centrum dekodującego stanowiącego część wierzchołka. Jedynym połączeniem między wierzchołkiem a podstawą jest helisa H28. Przewężenie pełni rolę „stawu” umożliwiającego zmianę konformacji wierzchołka podczas kolejnych etapów translacji. Różnorodność kształtu wierzchołka uwidoczniona została dzięki mikroskopii krioelektronowej [8] oraz rentgenografii [1]. Zmiana konformacji wierzchołka wydaje się być skorelowana z ruchem platformy na skutek asocjacji z podjednostką 50S lub przyłączenia czynnika inicjacyjnego IF3 [8].

Niższa część podstawy, określana jako stopa podjednostki, ma zwartą strukturę, podczas gdy wyższa partia podjednostki 30S tworzy elastyczny region obejmujący szczelinę miejsca dekodującego, platformę i ramię [6]. Stopa utworzona jest z helis H6-H11 oraz białka S20 i uważa się, że funkcjonuje jako element kontrolujący względną orientację domeny na powierzchni podjednostki, jak i w obrębie centrum dekodującego. Białko S20 jest jedynym białkiem obecnym na powierzchni podstawy. W znacznym stopniu przyczynia się ono do procesu dekodowania. Brak białka S20 w rybosomach powodu-

je błędy odczytywania mRNA, zwiększoną wrażliwość na temperaturę, redukcję zdolności do asocjacji z dużą podjednostką oraz osłabienie oddziaływań kodon-antykodon [38]. Białko to może utrzymywać odpowiednią konformację helisy H44 stanowiącej część centrum dekodującego, ma też zdolność wiązania mRNA. Umieszczenie białka S20 na spodzie podjednostki 30S jest zgodne z wynikami badań biochemicznych [1] oraz wcześniejszym modelem [39]. Można się też spotkać z wynikami wskazującymi na jego umiejscowienie w rejonie ramienia jak i wierzchołka [40]. Na spodzie podjednostki zlokalizowano również białko S16 [6]. W obrębie podstawy, równoległe do pionowej helisy H44 biegnie helisa H7 rozwidlająca się w wyższej części do helisy H8. Stanowi to granicę między niższą, zwartą częścią podstawy, a jej wyższym regionem.

Ramię składa się głównie z dwóch wydłużonych struktur helis H15/H18 i H16/H17. Równoległe ułożenie tych struktur i ich wzajemne oddziaływanie wydaje się stanowić szkielet tej części małej podjednostki. Dzięki prostopadłemu ułożeniu helis H3 i H4, utworzona zostaje zwarta struktura ramienia, złożona z połączonych pięciu helis (H3/H4/H16/H17/H18 16S rRNA). Pętla helis ramienia (H16 i H18) tworzą jedną część tzw. zatrasku (ang. *latch*), przez który przypuszczalnie przechodzi mRNA. Przy rozdzielczości 3.3 Å [6] jedynym widocznym białkiem na powierzchni ramienia podjednostki 30S oddziałującej z dużą podjednostką jest białko S12. Prawdopodobnie oddziałuje ono z mRNA, co może wskazywać na udział w procesie dekodowania, gdyż jego mutacja wzmacnia wierność translacji [33]. Uzyskana wcześniej struktura krystaliczna małej podjednostki z *T. thermophilus* uwidoczniła dodatkowo na powierzchni ramienia obecność części białka S7 [1, 37]. S7 może być zaangażowane w wiązanie P-tRNA D-tRNA do małej podjednostki [6], ze względu na jego położenie w pobliżu miejsc P i E [37].

Centrum dekodujące jest odpowiedzialne za kontrolę wierności oddziaływań kodon-antykodon. Zlokalizowano je w niższej części wierzchołka i wyższej części podstawy [6]. Sekwencja 16S rRNA w tym regionie wykazuje znaczny konserwatyzm co jest zgodne z uniwersalnością procesu dekodowania. W skład centrum wchodzi helisa H44 (tworząca też mostki pomiędzy podjednostkami [2]) (Ryc. 4A, 4D), helisa H45, H27 (pełniący funkcję przełącznika, który został dokładnie opisany w rozdziale dotyczącym allosterii rybosomu) (Ryc. 4B), centralny pseudowęzeł, helisa H18 (wraz z pętlą występującą w jej strukturze), helisa H34 (jest to główna struktura

poprzeczna wierzchołka) oraz końce 3' i 5' 16S rRNA, [6]. Nukleotydy helisy H44 16S rRNA (1492-1498 tworzące pary zasad z 1402-1408) (Ryc.4D) tworzą miejsca A i P wiązania AA-tRNA i P-tRNA [6]. Koniec 3' 16S rRNA jest wysoce elastyczny i zawiera on sekwencję anty-Shine-Dalgarno. Zlokalizowana jest ona w pobliżu białka S11 oraz miejsca wiązania czynnika inicjującego IF3 [41]. Sekwencja ta bierze udział w inicjacji translacji. Pomiedzy podstawą a wierzchołkiem podjednostki 30S elementy centrum dekodującego tworzą wydłużoną, zagiętą strukturę określoną przez *S c h l u e n z e n ' a* jako tunel [6], przez który przechodzi mRNA (Ryc. 5A). Tunel ten powstaje dopiero w wyniku asocjacji podjednostek i związanych z tym zmian konformacyjnych małej podjednostki (Ryc.5A, 5B) [8]. Wejściem do tego tunelu, utworzonym między helisami ramienia i nosa wierzchołka [6], jest zatrask (porównaj Ryc.1B, na którym strzałkami zaznaczono omówione elementy strukturalne, \*,# wskazują miejsca kontaktu ramienia z wierzchołkiem).

Pętla antykodonowa AA-tRNA i P-tRNA w miejscach A i P nie oddziałują z żadnym białkiem małej podjednostki. Struktura 16S rRNA wymusza zdefiniowaną funkcjonalnie architekturę elementów oddziałujących i interakcję kodonu mRNA z antykodonom tRNA. Badanie struktury miejsc P i E ujawniło przykład mimikry struktury białek i sekwencji RNA z nimi związanych. Kształt kompleksu utworzonego przez helisę H30 16S rRNA oddziałującą z P-tRNA w miejscu P jest podobny do struktury kompleksu deacylowanego tRNA związanego z białkiem S7 w miejscu E [6].

#### IV. Dynamika oddziaływań między podjednostkami

Rozwiązanie metodami rentgenograficznymi struktury rybosomu z *Thermus thermophilus* [2] w znacznym stopniu przyczyniło się do określenia lokalizacji oddziaływań pomiędzy podjednostkami tworzącymi funkcjonalny kompleks 70S. Zostały one opisane w naszym poprzednim artykule w *Postęпах Biochemii* [4]. Struktura rybosomu *Escherichia coli* uzyskana dzięki mikroskopii krioelektronowej [7] pozwoliła dokładniej określić budowę elementów łączących podjednostki (Tabela 3) (Ryc. 1A, 1B).

Porównanie struktury izolowanych podjednostek [1, 3] z funkcjonalnymi kompleksami 70S [2,7] wskazuje na ruch elementów tworzących mostki [35]. Szczególnie interesująca pod tym względem jest przedostatnia helisa 16S rRNA (H44) (Ryc. 4D),

**Tabela 3**

Mostki łączące podjednostki 30S i 50S, na podstawie [1, 2, 3, 5-7, 48]. Graficzne przedstawienie mostków zawiera rycina 1 (Ryc. 1).

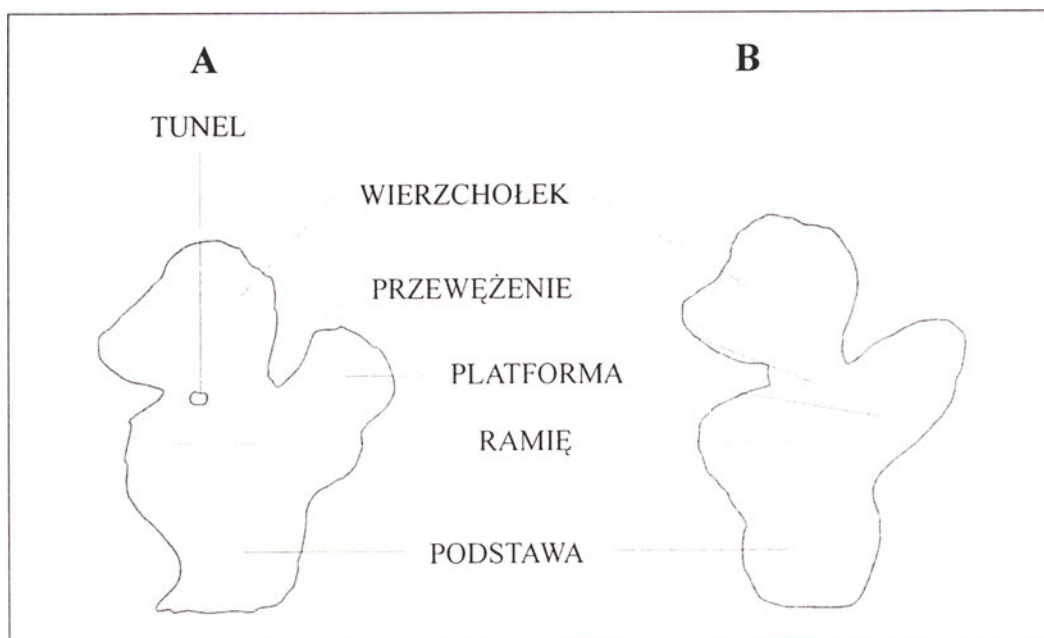
Mostki	Oddziaływanie			
	16S rRNA	23S rRNA	Białka	Ogólnie
B1a		H38 domeny II		Wierzchołek podjednostki 30S z centralną wypukłością 50S
B1b B1c				Wierzchołek podjednostki 30S z centralną wypukłością 50S w miejscu występowania 5S rRNA
B2a	H44 położona na platformie 30S	H69 położona w szczelinie miejsca aktywnego		
B2b B2c B2d B2e <sup>1</sup>	H24 H27 H23b H23a	}H68,H71	L3 S11 L2	Platforma 30S z obręczą szczeliny miejsca aktywnego 50S
B5a	H44	H63	L14 położone w pobliżu domeny $\alpha$ -sarcyny	Palec ramienia 30S
B6 <sup>2</sup> B5b B3	Pętla H44 H44 H44		L14	
B4		H69	S15	

B2e<sup>1</sup> Brak mostka u *T. thermophilus* [2]; u *E. coli* połączenie to określono jako silne [7].

B6<sup>2</sup> U *T. thermophilus* mostkiem B6 określono strukturę utworzoną przez inne elementy [2, 4].

której wyższa część bierze udział w procesie dekodowania i kontroli wierności oddziaływań kodon-anty-kodon. Helisa H44 tworzy mostki z podjednostką 50S aż w pięciu regionach B2a, B3, B5a i b, B6 [7]. Struktura tych długich połączeń odgrywa rolę w dy-

namicy rybosomu. Porównanie struktury izolowanej podjednostki 30S [1] wskazuje na przesunięcie H44 po asocjacji podjednostek [7]. Helisa ta może funkcjonować jako czujnik rozpoczynający składanie kompleksu funkcjonalnego 70S z podjednostek i ini-



Ryc. 5. Schemat podjednostki 30S, na podstawie [8], A — izolowana podjednostka 30S, B — schemat konformacji podjednostki 30S po asocjacji z dużą podjednostką

cjujący zmiany strukturalne regionu dekodującego [7].

Małe zmiany konformacyjne przyległych regionów podjednostki 50S mogą powodować względnie dużą rearanżację komponentów podjednostki 30S. Najprawdopodobniej struktury te odgrywają zasadniczą rolę w asocjacji i koordynacji funkcji dwóch podjednostek. Na szczególną uwagę zasługują mostki B3 i B2c [1, 2], których zmiana konformacyjna powiązana została z translacją. Zmiany konformacyjne helisy H27 16S rRNA, powodują bardzo duże zmiany struktury H44, a także bardziej odległych części podjednostki [35], co spowodowało zmianę struktury mostków B1b i B1c.

W wyniku asocjacji podjednostek do funkcjonalnego kompleksu 70S, mała podjednostka podlega wielu zmianom (Ryc. 5A, 5B). Asocjacja powoduje zbliżenie wierzchołka do ramienia, aż do utworzenia połączenia między nimi. W wyniku tego powstaje tunel dla mRNA. Platforma natomiast głównie w części szczytowej związa się ku wierzchołkowi. Zasięg zmian konformacyjnych obejmuje wierzchołek poprzez przewężenie do platformy i ramienia, co pokrywa się z lokalizacją najważniejszych funkcjonalnie domen 16S rRNA. Sekwencje te charakteryzują się również wysokim konserwatyżmem [8]. Wierzchołek podjednostki jest przyłączony do podstawy tylko za pomocą jednej helisy, co tłumaczy zdolność tej części podjednostki do niezależnego ruchu [42]. Miejsce zbiegu wierzchołka, platformy i ramienia jest miejscem oddziaływania pętli antykodonowych AA-tRNA i P-tRNA<sup>Met</sup> w miejscach A i P [40]. W pobliżu przewężenia zlokalizowany jest też region dekodujący (sekwencja anty-Shine-Dalgarno na platformie w regionie 530 16S rRNA) odgrywający ważną rolę w oddziaływaniu AA-tRNA w miejscu A. Region ten jest umiejscowiony w pobliżu ramienia. Mniej wyraźne zmiany konformacyjne zachodzą w podstawie podjednostki 30S. Zmiany konformacyjne podjednostki 30S wywołane asocjacją z dużą podjednostką powodują całkowicie odmienny rozkład białek rybosomalnych i rRNA w miejscu oddziaływania AA-tRNA. W konsekwencji tych zmian obserwujemy różnice oddziaływania tRNA<sup>Met</sup> i P-tRNA w miejscu P porównując fazy inicjacji i elongacji [8]. Poprzez interpretację tych przemian konformacyjnych można tłumaczyć specyficzny mechanizm rozpoznawania przez rybosom inicjatorowego i elongacyjnego tRNA<sup>Met</sup>. Zmiany konformacyjne ważnych funkcjonalnie regionów prawdopodobnie ułatwiają kolejne fazy etapu elongacji. Szczególnie ważną rolę mogą one odgrywać podczas translacji.

## V. Mechanizm translacji

Proces biosyntezy białka obejmuje trzy etapy: inicjację, elongację i terminację. Zarówno inicjacja jak i terminacja zależą od występowania specyficznych kodonów tj. kodonów start oraz stop w mRNA. U prokariota faza inicjacji jest kontrolowana przez trzy czynniki inicjacyjne IF-1, IF-2, IF-3. Faktor inicjacyjny IF-2 najprawdopodobniej tworzy kompleks potrójny z GTP oraz inicjatorowym tRNA<sup>Met</sup> niosącym N-formylometioninę [43]. IF-3 znany jest jako czynnik antyasocjacyjny, wiąże się do rybosomalnej podjednostki 30S i zapobiega jej asocjacji z dużą podjednostką [8]. Jak już wspomniano utworzenie kompleksu funkcjonalnego 70S powoduje liczne zmiany konformacyjne w obrębie podjednostek.

Zaproponowano wiele modeli wiązania tRNA na rybosomie podczas etapu elongacji. Trzy z nich uważamy za zasadnicze: allosteryczny model trójmiejskowy, model stanu hybrydowego oraz model  $\alpha$ - $\epsilon$  (modele te zostały omówione w naszym wcześniejszym artykule w *Postęпах Biochemii* [4]). Intensywne badania cyklu elongacyjnego nie potwierdziły w pełni żadnego z zaproponowanych modeli, jednakże model allosteryczny oraz  $\alpha$ - $\epsilon$  są najlepiej udokumentowane danymi eksperymentalnymi [6, 44]. Kilka innych propozycji mechanizmu aktywności rybosomu nie spotkało się z pozytywną weryfikacją w pracach eksperymentalnych [26 i prace tam cytowane].

W elongacji biorą udział dwa czynniki EF-Tu i EF-G. Czynnik EF-Tu składa się z trzech domen tworzących dwie jednostki strukturalne o różnym względem siebie układzie, w zależności od stanu funkcjonalnego [43]. EF-Tu tworząc kompleks potrójny z GTP i AA-tRNA, ochrania przed hydrolizą wiązanie estrowe i dostarcza AA-tRNA do rybosomalnego miejsca A. W miejscu tym zachodzi dwuetapowa selekcja AA-tRNA zależna od kodonu: przed hydrolizą GTP związanego z EF-Tu (ang. *initial selection*) oraz po hydrolizie EF-Tu-GTP, ale przed utworzeniem wiązania peptydowego (ang. *proofreading*) [42].

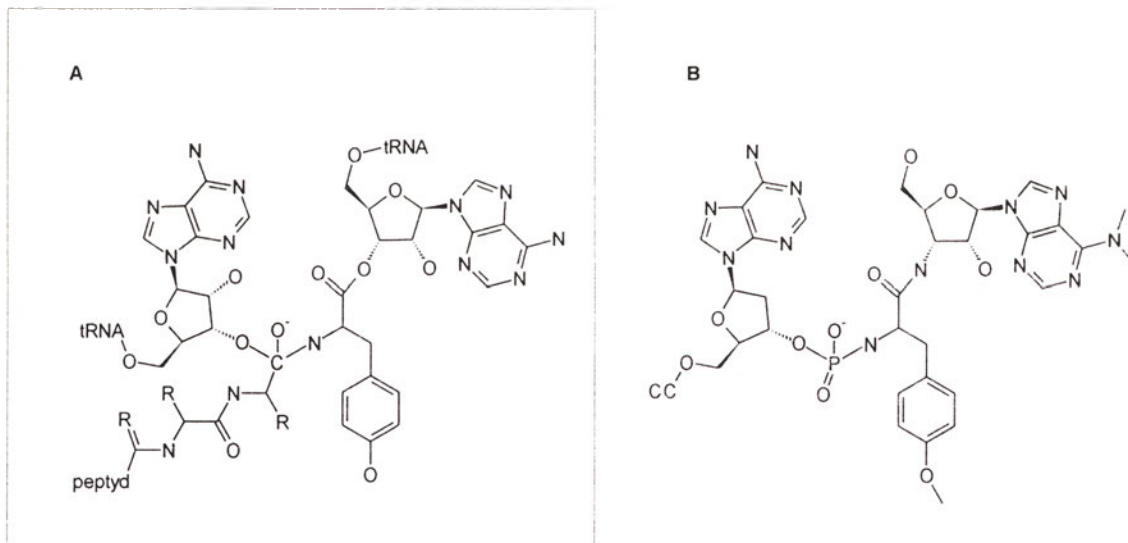
Rozpoznanie odpowiedniego kodonu przez antykodon AA-tRNA powoduje stabilizację kompleksu potrójnego przez oddziaływanie AA-tRNA z mRNA jak I rybosomem. Oddziaływanie kodon-antykodon jest sygnałem aktywującym centrum GTPazowe rybosomu ze związanym kompleksem EF-Tu-GTP-AA-tRNA [45], w wyniku czego ma miejsce hydroliza GTP. Miejsca oddziaływania czynnika EF-Tu z podjednostkami rybosomalnymi zostały opisane we wcześniejszym artykule w *Postę-*

*pach Biochemii* [4]. Pętla antykodonowa AA-tRNA w miejscu A oraz P-tRNA w miejscu P oddziałują wyłącznie z elementami małej podjednostki. Nie jest znany mechanizm przekazywania sygnału z miejsca oddziaływania kodonu mRNA z pętlą antykodonową AA-tRNA do domeny G EF-Tu. Wykazano udział AA-tRNA w przekazywaniu tego sygnału [45], jednakże nie wyklucza to możliwości jego transmisji za pośrednictwem rybosomu. Zdawałyby się o tym świadczyć liczne mostki utworzone pomiędzy podjednostkami (patrz *Postępy Biochemii* [4]) oraz ich zmiany konformacyjne na różnych etapach procesu biosyntezy białka [7, 8].

Helisa H44 16S rRNA biorąca udział w procesie dekodowania oraz kontroli wierności oddziaływać kodon-antykodon jednocześnie tworzy mostki z podjednostką 50S [7]. W przekazywanie sygnału aktywującego może być także zaangażowane białko S11, któremu przypisuje się udział w selekcji AA-tRNA [20], tworzące kolejny mostek (B2d). Możliwy jest

ich ruch względem siebie wpływa na zmianę konformacji całego słupka. Ze względu na powiązania zmiany konformacji w obrębie podjednostek, jak i dynamicznej struktury łączących je mostków, do tej pory nie udało się ustalić drogi przekazywania sygnału aktywującego hydrolizę GTP związanego z EF-Tu. Wykazano jednak, że izolowany tetramer białek L7/L12 nie stymuluje hydrolizy GTP-EF-Tu, ale silnie wpływa na hydrolizę GTP związanego z EF-G [46], pomimo że w rybosomach miejsca oddziaływań obydwu czynników elongacyjnych częściowo się nakładają.

Hydroliza GTP i powstanie formy EF-Tu-GDP [6] powoduje oddysocjowanie czynnika z rybosomu ze względu na niskie powinowactwo formy GDP EF-Tu do AA-tRNA [45]. Umożliwia to zajęcie miejsca A przez koniec akceptorowy AA-tRNA na podjednostce 50S i utworzenie wiązania peptydowego między P-tRNA związanego w miejscu P, a AA-tRNA uwolnionego od czynnika EF-Tu w miejscu A. Zajęciu



Ryc. 6. Związek pośredni o tetraedrycznym rozkładzie wiązań, powstający podczas syntezy wiązania peptydowego (A) oraz jego analog — Inhibitor Yarus'a (B), na podstawie [9]. Zaciemnione obszary wskazują układ tetraedrycznych wiązań dla atomu węgla (A) oraz dla atomu fosforu (B).

też udział mostka B6 utworzonego pomiędzy pętlą helisy H44 16S rRNA a białkiem L14. Białko to umiejscowione jest w pobliżu domeny  $\alpha$ -sarcyny, z którą oddziałują czynniki elongacyjne. Zmiany w układzie tej domeny względem białek L14 i L6 stwierdzono, porównując struktury zaproponowane na podstawie wyników uzyskanych metodami rentgenograficznymi [2] i mikroskopią krioelektronową [7]. Obrót osi pętli  $\alpha$ -sarcyny powoduje zbliżenie jej 3' i 5' końca do białka L14. Wpływa to na pozycję tej struktury względem białka L11 i sekwencji rRNA z nim połączonej, a wchodzącej w skład centrum GT-Pazowego [7]. Te dwie struktury usytuowane są w dwóch różnych płatach podstawy słupka L7/L12 i

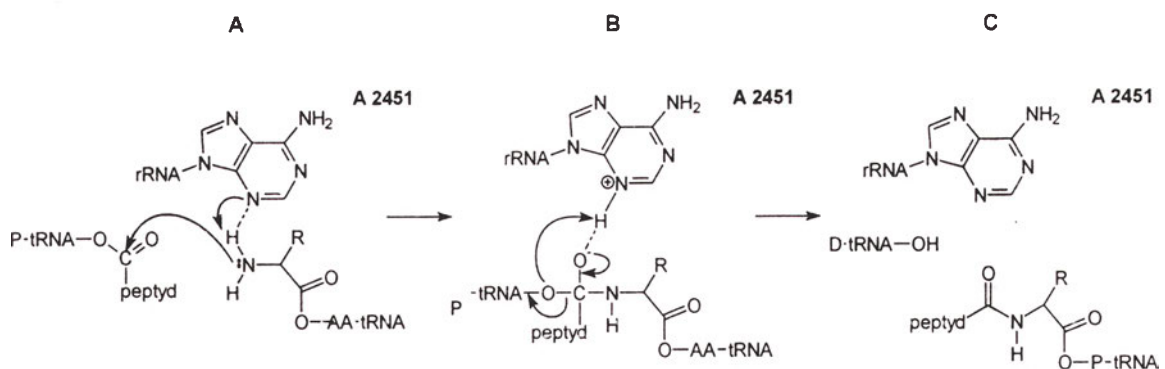
przez AA-tRNA miejsca A może towarzyszyć obrót całej cząsteczki lub tylko jej ramienia akceptorowego względem domeny antykodonowej [47]. Rybosom z zajęтым miejscem A przez AA-tRNA oraz miejscem P przez P-tRNA znajduje się w tzw. stanie pretranslokacyjnym (PRE). Pętla antykodonowa tych dwóch cząsteczek tRNA znajdują się w bezpośrednim sąsiedztwie wejścia do tunelu dla mRNA [48] przechodzącego w pobliżu przewężenia podjednostki 30S. Pętla antykodonowa AA-tRNA jest ulokowana po stronie ramienia, podczas gdy pętla antykodonowa P-tRNA od strony platformy tunelu. Miejsce A utworzone jest przez ramię w pobliżu regionu pętli 530. Region 1400/1500 tworzy miejsce P.



Tak więc domeny antykodonowe AA-tRNA i P-tRNA w miejscach A i P są ułożone w centrum dekodującym małej podjednostki. Koniec 3'CCA ramienia akceptorowego cząsteczki AA-tRNA w miejscu A skierowany jest natomiast ku wejściu do tunelu na podjednostce 50S. Cząsteczki AA-tRNA i P-tRNA w miejscach A i P dużej podjednostki znajdują się blisko białek L10e oraz L5 [9]. Obydwa te białka oddziałują z 5S rRNA. Możliwe jest, że 5S rRNA pomaga stabilizować związane w tych miejscach cząsteczki tRNA co byłoby zgodne z obserwacją, że 5S rRNA wzmacnia aktywność rybosomu, ale jego obecność nie jest absolutnie konieczna do utrzymania aktywności rybosomu [49]. Cząsteczka AA-tRNA w miejscu A oddziałuje z wysoce konserwatywną pętlą 23S rRNA, która wraz z białkiem L10e tworzy dużą, wklęsłą powierzchnię łączącą się z helisą TΨC cząsteczki tRNA, wykorzystując to samo miejsce wiązania co EF-Tu [9]. Nukleotyd C75 ramienia akceptorowego AA-tRNA tworzy natomiast pary Watsona-Cricka z guaniną G2553 pętli miejsca A. Oddziaływanie to jest zgodne z wcześniejszymi opisanymi wynikami [50].

Synteza wiązania peptydowego między grupą aminową AA-tRNA a karboksylową peptydylotRNA zachodzi poprzez utworzenie związku przejściowego — węgla o tetradrycznym układzie wiązań (Ryc. 6A) [9]. Wykorzystanie analogu związku przejściowego (tzw. inhibitor Yarus'a) umożliwiło wyjaśnienie mechanizmu reakcji tworzenia wiązania peptydowego podczas elongacji. Inhibi-

odpowiednikiem atomu węgla o tetradrycznym układzie wiązań związku przejściowego; reszta CCA oddziałuje z miejscem P na podjednostce 50S. Rozwiązanie struktury podjednostki 50S przy rozdzielczości 2,4 Å uwidocznili położenie reagujących grup podczas syntezy wiązania peptydowego. W ich pobliżu nie ma białek co wskazuje, że za aktywność katalityczną odpowiedzialne jest rRNA a nie jak dotychczas sądzono — białka rybosomalne. Inhibitor Yarus'a wiąże się do dużej podjednostki na dnie szczeliny przy wejściu do tunelu, który biegnie ku tyłowi podjednostki. Miejsce to otoczone jest nukleotydami centralnej pętli domeny V 23S rRNA, tworzącymi centrum peptydylotransferazowe, czyli region odpowiedzialny za syntezę wiązania peptydowego. Nukleotydami odgrywającymi kluczową rolę w obrębie centrum aktywnego są: A2450, A2451, G2447, G2061 (Ryc. 7) co potwierdzają również liczne badania biochemiczne [51,52 i prace tam cytowane]. Mutacje w obrębie centrum powodują utratę aktywności katalitycznej w tworzeniu wiązania peptydowego [53] oraz oporność na antybiotyki będące jej inhibitorami [54]. Reszta fosforanowa inhibitora Yarus'a wiąże się w pobliżu jednoniciowych odcinków centrum peptydylotransferazowego. Z domeną V 23S rRNA oddziałuje 15 białek, jednak w pobliżu inhibitora brak jest domen globularnych zdolnych do katalizowania reakcji. Wcześniej nie wykluczano udziału białek L2 i L3 w aktywności peptydylotransferazowej. Ich rozciągnięte domeny penetrują szkielet domeny V 23S rRNA. Sekwencja LrRNA ota-



Ryc. 7. Dyskutowany w tekście mechanizm tworzenia wiązania peptydowego, na podstawie [9].

tor Yarus'a zbudowany jest z oligonukleotydu zawierającego sekwencję CCA połączonego przez grupę fosfoamidową z puromycyną (Ryc. 6B). Puromycyna jest analogiem AA-tRNA i przyłącza się do rybosomalnego miejsca A; grupa fosfoamidowa jest

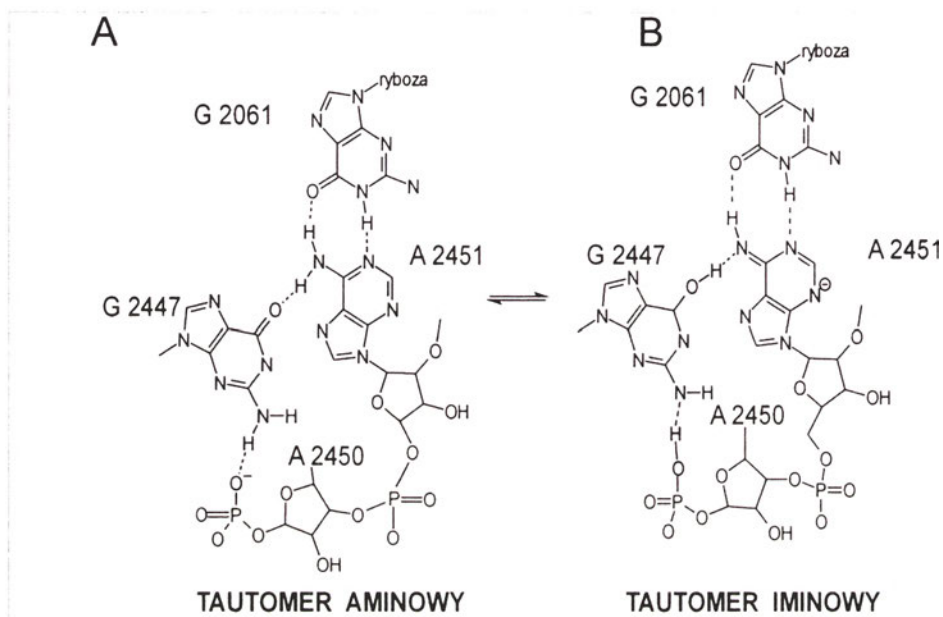
czająca inhibitor Yarus'a jest ściśle upakowana w podobny sposób do miejsc aktywnych enzymów białkowych, a nukleotydy oddziałujące z inhibitorem są wysoce konserwatywne we wszystkich trzech królestwach [9]. Mapa gęstości elektronowej rybo-

somalnej podjednostki 50S bez związanych ligandów [5] ukazuje wiele wiązań wodorowych w krytycznym rejonie miejsca aktywnego, utworzonych także za pośrednictwem wody. W obrębie centrum aktywnego występują również jony  $Mg^{2+}$  i  $K^+$  stabilizujące jego strukturę. Możliwość udziału 23S rRNA w tworzeniu wiązania peptydowego z wykluczeniem białek postulowano już w 1998 roku [55].

Za aktywność katalityczną najprawdopodobniej odpowiedzialny jest nukleotyd A2451, który znajduje

się w wiązaniu amidowego, peptydowego, glikozydowego oraz tworzenia wiązań C-C [57]. Na podstawie tych danych wysunięto hipotezę, iż rybosom pełni również funkcję rybozomu [9].

Utworzenie wiązania peptydowego stymuluje spontanicznie translokację [59]. Za ten etap elongacji odpowiedzialny jest czynnik EF-G. Chociaż translokacja może też zajść bardzo wolno bez udziału tego czynnika [36], hydroliza GTP związanego z EF-G jest konieczna do szybkiej reakcji. Hy-



Ryc. 8. Tautomer aminowy (A) i iminowy (B) A2451 oraz G2447 wraz z resztami tworzącymi centrum peptydylotransferazowe, na podstawie [9]. Zaciemnione obszary wskazują różnice między formami tautomerycznymi.

je się najbliższej reagujących grup (Ryc. 7) [9]. Protonacja azotu w pozycji trzeciej (N3) nukleotydu A2451 umożliwia tworzenie wiązania wodorowego z atomem tlenu reszty fosforanowej inhibitora, stabilizując związek pośredni (Ryc. 7A). A2451 funkcjonuje jako zasada Lewisa. Reszty 23S rRNA zaangażowane w tworzenie centrum mogą występować w dwóch formach tautomerycznych: aminowej lub rzadziej iminowej (Ryc. 8A, 8B). W wyniku oderwania atomu wodoru przez N3 A2451 z reszty  $\alpha$ -aminowej (Ryc. 7B), następuje nukleofilowy atak atomu azotu z grupy  $\alpha$ -aminowej na atom węgla peptydylotRNA. Proton zostaje następnie przekazany z N3 na koniec 3' deacylowanego tRNA, związanego w miejscu P, zaraz po odłączeniu od niego nowo utworzonego peptydu (Ryc. 7C). Mechanizm katalizowania syntezy wiązania peptydowego przez rybosom jest analogiczny do poznanych wcześniej właściwości katalitycznych rybozymów [56]. Rybozymy są to cząsteczki RNA posiadające aktywność katalityczną, np.: przenoszenia grup acylowych, tworzenia

droliza fosforanu indukuje zmiany konformacyjne czynnika elongacyjnego, co skorelowane jest ze zmianami struktury rybosomu pozwalającymi na przesunięcie związanych z nim cząsteczek tRNA. Uzyskana struktura krystaliczna EF-G z *T. thermophilus* ukazała podobieństwo budowy dwóch (domeny 1 i 2) z pięciu domen do EF-Tu. Domeny 3, 4, 5 czynnika EF-G naśladują natomiast kształt AA-tRNA [44]. W strukturach krystalicznych kompleksów rybosom-EF-G [36] w stanie pre- i post-translokacyjnym (POST) nie udało się jednak doposażyć w pełni struktury krystalicznej samego czynnika, co wskazuje na przyjmowanie przez niego różnych konformacji w zależności od stanu rybosomu. W stanie PRE EF-G łączy szczeliną między podjednostkami rybosomu. Domena 1 czynnika oddziałuje ze słupkiem L7/L12 podjednostki 50S, a domena 4 EF-G z ramieniem podjednostki 30S przy dnie szczeliny utworzonej między wierzchołkiem a ramieniem. Konformacja EF-G w kompleksie pretranslokacyjnym wydaje się być bardziej „otwarta” w porówna-

niu ze strukturą krystaliczną izolowanego czynnika. Istotnym faktem jest jego kontakt ze słupkiem L7/L12, ponieważ wykazano że izolowane białka L7/L12 silnie stymulują hydrolizę GTP związanego z EF-G [46], chociaż indukowanie tej hydrolizy przez cały rybosom jest bardziej efektywne. W stanie POST (gdzie D-tRNA zajmuje miejsce E, a P-tRNA miejsce P) zmianie ulega zasięg oddziaływań EF-G z rybosomem. Wierzchołek domeny 4 czynnika sięga głęboko ku centrum dekodującemu [36]. Widoczne jest przesunięcie czynnika w kierunku podjednostki 30S, tworząc dodatkowe połączenie z jej podstawą i wierzchołkiem. Oddziaływanie EF-G z dużą podjednostką ogranicza się do kontaktu domeny 1 czynnika z globularną częścią słupka L7/L12. Możliwe jest, że uwolnienie fosforanu w pozycji  $\gamma$  z GTP przyłączonego do EF-G indukuje zmiany struktury czynnika, które kierują następnie zmianami konformacyjnymi podjednostek, co z kolei umożliwia translację.

Jak już wspomniano, stan POST charakteryzuje się związaniem P-tRNA w miejscu P oraz D-tRNA w miejscu E. W strukturze krystalicznej podjednostki rybosomalnej 50S *H. marismortui* [9] wykazano silne oddziaływanie D-tRNA w miejscu E z białkiem L44e. Wykazano, że u *E. coli* w przyłączenie D-tRNA w miejscu E zaangażowane są nukleotydy 2112, 2116, 2169 oraz region 2109-2119 23S rRNA [8]. Nukleotydy te zlokalizowane są w miejscu wiązania białka L1 domeny V 23S rRNA (2090-2200 23S rRNA). Przeprowadzone badania [58] wskazują nawet na możliwość istnienia dwóch miejsc wyjścia, tzw. E i E2. Odległość między antykodonami P-tRNA i D-tRNA w miejscach P i E jest porównywalna do odległości między miejscami A i P co może świadczyć o tym, że pętla antykodonowa w miejscu E odczuwa jeszcze z kodonem mRNA. Znacznie większy dystans dzieli miejsce E od E2. Z tego względu interakcja z kodonem w miejscu E2 wydaje się mało prawdopodobna, a D-tRNA może zostać uwolniony z E2 przed ponownym zajęciem miejsca E przez tRNA w kolejnej rundzie cyklu elongacyjnego. Wykazano również, że koniec 3'CCA P-tRNA w miejscu P tworzy dwa wiązania wodorowe z pętlą P (z G2251 i G2252), podczas gdy AA-tRNA z pętlą A tylko jedno (z G2553) [9]. Ruch cząsteczki tRNA z miejsca A do P związany jest więc ze zwiększeniem oddziaływań. Ponadto końce 3'CCA AA-tRNA i P-tRNA w miejscu A i P są obrócone względem siebie o  $80^\circ$ . Wynika stąd, że w tych dwóch miejscach wzajemny układ między końcem 3'CCA, a akceptorową odygą tRNA nie może być tak samo stabilny. Jeżeli konformacja AA-tRNA związanego w miejscu

A jest mniej stabilna, przesunięcie cząsteczki do miejsca P po utworzeniu wiązania peptydowego byłoby energetycznie korzystne [9].

## VI. Allosteria rybosomu prokariotycznego

Asocjacja podjednostek oraz przyłączenie do rybosomu ligandów takich jak mRNA, tRNA czy czynniki elongacyjne (EF-Tu, EF-G) indukują zmiany konformacyjne podjednostek. Wyniki wcześniejszych badań wykazały, że rybosom występuje w dwóch stanach konformacyjnych [48] zgodnie z istnieniem dwóch stanów allosterycznych rybosomu: PRE i POST. Na tej podstawie sugerowano, że podjednostka 30S ma bardziej dynamiczną strukturę niż duża podjednostka 50S. Najbardziej elastyczną częścią 50S wydawał się słupek L7/L12 występujący w formie zwiniętej lub rozwiniętej w zależności od etapu cyklu elongacyjnego. Innymi wysoce elastycznymi strukturami dużej podjednostki są: centralna wypukłość oraz słupek L1 [8]. Wszystkie te regiony oddziałują z tRNA podczas kolejnych faz elongacji. Słupek L7/L12 znajduje się w pobliżu miejsca A (miejsca wiązania AA-tRNA), region L1 — miejsca E (miejsca wiązania D-tRNA), a miejsce P (wiążące P-tRNA) znajduje się pomiędzy mini, blisko centralnej wypukłości.

Przyłączenie aminoacylo-, peptydylo- lub deacylowanego tRNA do rybosomu powoduje zmiany konformacji słupka L7/L12. W zależności od stanu rybosomu (PRE lub POST) tetramer ten wykazuje różne stopnie rozwinięcia [8]. Kompleks posttranslokacyjny wykazuje gęstość w bezpośrednim sąsiedztwie słupka, po stronie powierzchni oddziałującej z małą podjednostką. Struktura rybosomu ze związanym EF-G również wykazała, że słupek L7/L12 w tym kompleksie przyjmuje niezwykle stabilną, dobrze rozwiniętą konformację. Wskazuje to na zaangażowanie tego regionu w translację. Miejsce wiązania D-tRNA do rybosomu (nukleotydy 2112, 2116, 2169 oraz region 2109-2119 23S rRNA) pokrywa się z sekwencją przyłączającą białko L1 (2090-2200 domeny V 23S rRNA). U *E. coli* wiązanie D-tRNA do miejsca E indukuje zmiany konformacyjne tego regionu. Podobne zmiany konformacyjne zachodzą po związaniu P-tRNA jak i D-tRNA do miejsca P. Wykazano oddziaływanie odpowiednio P-tRNA i D-tRNA w miejscach P i E z przyległymi regionami tj. z nukleotydami 2111-2112 23S rRNA i z białkiem L33. Związanie inicjatorowego tRNA<sup>Met</sup> w miejscu P indukuje zmiany konformacyjne w miejscu kontaktu wierzchołka 30S z centralną wy-

pukłością podjednostki 50S. Może to być wynikiem zmian konformacyjnych 5S rRNA leżącego w obrębie tej wypukłości [8].

Autorzy najnowszych badań sugerują występowanie dwóch alternatywnych możliwości tworzenia par zasad w obrębie regionu 912 w 16S rRNA podjednostki 30S (Ryc. 4E, 4F) [35]. Udowodniono, że przesunięcie par zasad z pozycji 912-910/885-887 do 912-910/888-890 wpływa nie tylko na wiązanie mRNA i tRNA do rybosomu, ale także wywołuje wielkoskalowe zmiany konformacyjne. Wierzchołek, ramię i platforma zmieniają swój wzajemny układ w podjednostce 30S i wpływają w ten sposób na regiony mostków podjednostki 50S, a szczególnie centralnej wypukłości. Przesunięciu par zasad towarzyszy obrót wierzchołka ku dużej podjednostce oraz zgięcie platformy w stronę słupka L1. Zmiany konformacyjne zachodzą również w niższej części podstawy (miejsca występowania mostka B6), które przesuwa się w kierunku dużej podjednostki, podczas gdy ramię odsuwa się od regionu oddziaływań między podjednostkami. Powoduje to „zanik” palca ramienia (ang. *shoulder finger*), który w konformacji 912-888 łączy się z platformą i podjednostką 50S (mostek B3) [35].

Region 912 jest umiejscowiony pomiędzy H2 i H27 16S rRNA, w pobliżu miejsca połączenia ramienia, platformy i przewężenia podjednostki 30S. Połączenie helisy H27 do nukleotydów 912-910 stanowi względnie długi, jednoniciowy region. Najbardziej znaczące zmiany konformacyjne zachodzą w tym regionie i niższej części podjednostki 30S. Zaobserwowane zmiany konformacyjne mogą być związane z rearanzacją H44, która bierze udział w tworzeniu mostków łączących podjednostki [7, 35] (Rys. 4D). Zmiana parowań w regionie 912 [35] wpływa także na układ helis H22 i H23 16S rRNA (H23 zaangażowany jest w tworzenie dwóch mostków: B2d i B2e) oraz białka S11 (któremu również przypisuje się rolę w tworzeniu mostka B2d) (Ryc. 4B) [7]. Znaczne zmiany zachodzą w regionach podjednostki 50S przylegających do platformy. Są to: centralna wypukłość obejmująca 5S rRNA (mostki B1b, B1c), wejście do tunelu oraz region mostka B3. Zmiana konformacji 16S rRNA z 912-910/885-887 do 912-910/888-890 wpływa również na układ przestrzenny tunelu utworzonego między przewężeniem, wierzchołkiem i ramieniem podjednostki 30S. Konformacja 912-910/885-887 jest optymalna do wiązania cząsteczki AA-tRNA zarówno do mRNA jak i rybosomu. Zmiana konformacji do 912-910/888-890 faworyzuje dysocjację „nieodpowiednich” AA-tRNA. Stan 912-888 charakteryzuje się redukcją zdolności

do wiązania AA-tRNA, podczas gdy 912-885 powoduje wiązanie w miejscu A nawet cząsteczek AA-tRNA z „niepasującymi” do matrycy mRNA pętłami antykodonów [35]. Przesunięcie parowań regionu 912 16S rRNA odgrywa znaczącą rolę w procesie dekodowania indukując wielkoskalowe zmiany konformacyjne rybosomu uwidocznione dzięki mikroskopii krioelektronowej. Dokładne określenie dynamiki i zasięgu zmian struktury rybosomu podczas asocjacji podjednostek i kolejnych etapów procesu translacji wymaga przeprowadzenia jednak dokładniejszych badań.

## VII. Podsumowanie

Rozwiązanie struktury rybosomu pozwoliło na bardzo zaawansowaną, ale nadal tylko częściową interpretację molekularną wyników długoletnich wcześniejszych badań biochemicznych i genetycznych. Poznane zostały z bardzo dużą precyzją konformacje białek i kwasów nukleinowych oraz ich wzajemne oddziaływania. Szczegółowość i dokładność tych danych jest zasadniczym czynnikiem określającym wysoką wartość tych wyników. Pozostaje jednak wiele nierozwiązanych kwestii dotyczących mechanizmu translacji. Nieznany jest sposób koordynacji funkcji małej i dużej podjednostki podczas kolejnych etapów cyklu biosyntezy białka. Innym nierozwiązanym problemem jest sposób oddziaływania czynników elongacyjnych i powiązanie ich zmian konformacyjnych ze zmianą struktury rybosomu, np. podczas translacji.

Prawdopodobnie kolejnym etapem badań będzie rozpoznanie dynamiki rybosomu na podstawie rozwiązanych statycznych struktur krystalicznych uzyskanych metodą dyfrakcji promieni rentgenowskich.

## Podziękowania

Praca wykonana w ramach grantu Komitetu Badań Naukowych 6 PO6A 01421.

*Artykuł otrzymano 10 maja 2001  
Zaakceptowano do druku 10 stycznia 2002*

## Piśmiennictwo

1. Clemons WM, May JLC, Wimberly BT, McCutcheon JP, Capel MS, Ramakrishnan V (1999) *Nature* **400**: 833-840
2. Cate JH, Yusupov MM, Yusupova GZH, Earnest TN, Noller HF (1999) *Science* **285**: 2095-2104
3. Ban N, Nissen P, Hansen J, Capel M, Moore PB, Steitz TA (1999) *Nature* **400**: 841-847

4. Dudzińska B, Twardowski T (2001) *Post Biochem* **47(1)**:19-29
5. Ban N, Nissen P, Hansen J, Moore PB, Steitz TA (2000) *Science* **289**: 905-920
6. Schlunzen F, Tocilj A, Zarivach R, Harms J, Gluehmann M, Janell D, Bashan A, Bartels H, Agmon I, Franceschi F, Yonath A (2000) *Cell* **102**: 615-623
7. Gabashwili IS, Agrawal RK, Spahn CMT, Grassucci RA, Svergun DI, Frank J, Penczek P (2000) *Cell* **100**: 537-549
8. Agrawal RK, Lata RK, Frank J (1999) *The Int J Biochem & Cell Biol* **31**: 243-254
9. Nissen P, Hansen J, Ban N, Moore PB, Steitz TA (2000) *Science* **289**: 920-930
10. Wimberly BT, Guymon R, McCutcheon J, White SW, Ramakrishnan V (1999) *Cell* **97**: 491-502
11. Stark H, Orlova EV, Rinke-Appel J, Junke N, Mueller F, Rodnina M, Wintermeyer W, Brimacombe R, van Heel M (1997) *Cell* **88**: 19-28
12. Vladimirov SN, Druzina Z, Wang R, Cooperman BS (2000) *Biochem* **39**: 183-193
13. Corell CC, Munshikin A, Chan Y-L, Ren Z, Wool IG, Steitz TA (1998) *PNAS* **95**: 13436-13441
14. Wall JG, Gluck A, Endo Y (1992) *TIBS* **17**: 266-274
15. Corell CC, Freeborn B, More PB, Steinz TA (1997) *Cell* **91**: 705-712
16. Oswald M, Brimacombe R (1999) *NAR* **27**: 4635-4641
17. Sergiev P, Dokudovskaya S, Romanova E, Topin A, Bogdanov A, Brimacombe R, Dontsova O (1998) *NAR* **26**: 2519-2525
18. Worbs M, Huber R, Wahl MC (2000) *EMBO J* **19**: 807-818
19. Nakagawa A, Nakashina T, Taniguchi M, Hosaka H, Kimura M, Tanaka I (1999) *EMBO J* **18**: 1459-1467
20. Fanning TG (1978) *NAR* **5**: 933-950
21. Unge J, Aberg A, Al-Kharadaghi S, Nikulin A, Nikonov S, Davydova NL, Nevskaya N, Garber M, Liljas A (1998) *Structure* **6**: 1577-1586
22. Lieberman KR, Firpo MA, Herr AJ, Nguyenle T, Atkins JF, Gesteland RF, Noller HF (2000) *J Mol Biol* **297**: 1129-1143
23. Blyn LB, Risen LM, Griffey RH, Draper DE (2000) *NAR* **28**: 1778-1784
24. Draper DE, Reynaldo LP (1999) *NAR* **27**: 381-388
25. Meyer HA, Triana-Alonso F, Spahn ChMT, Twardowski T, Sobkiewicz A, Nierhaus KH (1996) *NAR* **24**: 3996-4002
26. Nawrot M, Bohun E, Książczak-Kus L, Sobkiewicz A, Polak J, Twardowski T (1998) *A Bioch Pol* **45**: 1053-1066
27. Madej-Dudzińska B, Nawrot M., Twardowski T (2000) *J P Phys* **156**: 56-569
28. Uchiumi T, Sato N, Wada A, Hachimori A (1999) *J Biol Chem* **274**: 681-686
29. Peltz SW, Hammel AB (1999) *Mol Cell Biol* **19**: 384-391
30. Grainzova O, Traut RR (2000) *Biochem* **39**: 4075-4081
31. Agarlov SC, Zheleznyakova EN, Selivanova OM, Zheleznyaya LA, Matvienko NI, Vasiliev VD, Spirin AS (1998) *PNAS* **95**: 999-1003
32. Lancaster L, Culver GM, Yusupova GZ, Cate JH, Yusupov MM, Noller HF (2000) *RNA* **5**: 717-729
33. Alksne LE, Anthony RA, Liebman SW, Warner JR (1993) *PNAS* **90**: 9538-9541
34. Agalarov S.C, Prasad GS, Funke PM, Stout CD, Williamson JR (2000) *Science* **288**: 107-112
35. Gabashwili IS, Agrawal RK, Grassucci R, Squires CL, Dahlberg AE, Frank J (1999) *EMBO* **18**: 6501-6507
36. Stark H, Rodnina MV, Wieden HJ, van Hell M, Wintermeyer W (2000) *Cell* **100**: 301-309
37. Fredrick K, Dunny GM, Noller HF (2000) *J Mol Biol* **298**: 379-394
38. Ryden-Aulin M, Shaoping Z, Kylsten P, Isaksson LA (1993) *Mol Microbiol* **7**: 983-992
39. Mueller F, Brimacombe R (1997) *J Mol Biol* **271**: 545-565
40. Gabashwili IS, Agrawal RK, Grassucci R, Frank J (1999) *J Mol Biol* **286**: 1285-1291
41. Tocilj A, Schlunzen F, Janell D, Gluehmann M, Hansen HA, Harms J, Bashan A, Bartels H, Agmon I, Franceschi F, Yonath A (1999) *PNAS* **96**: 14252-14257
42. Pape T, Wintermeyer W, Rodnina MV (2000) *Nature Struc Biol* **7**: 104-107
43. Clark BFC, Thirup S, Kjedaard M, Nyborg J (1999) *FEBS Lett* **452**: 41-46
44. Frank J, Heagle AB, Agrawal RK (1999) *J Struc Biol* **128**: 15-18
45. Piepenburg O, Pape T, Pleiss JA, Wintermeyer W, Uhlenbeck OC, Rodnina MV (2000) *Biochem* **39**: 1734-1738
46. Savelsbergh A, Mohr D, Wilden B, Wintermeyer W, Rodnina MV (2000) *J Biol Chem* **275**: 890-894
47. Stark H, Rodnina MV, Rinke-Appel J, Brimacombe R, Wintermeyer W, van Heel M (1997) *Nature* **389**: 403-406
48. Agrawal RK, Penczek P, Grassucci RA, Li Y, Leith A, Nierhaus KH, Frank J (1996) *Science* **271**: 1000-1002
49. Moore PB (1996) W: Zimmermann RA, Dahlberg AE (red) *Ribosomal RNA & Structure, Evolution, Processing and Function in Protein Biosynthesis*. CRC Press, Boca Raton, FL, str. 199-236
50. Green R, Switzer C, Noller HF (1998) *Science* **280**: 286-289
51. Mueller F, Sommer I, Baranov P, Matadeen R, Stoldt M., Wöhnert J, Görlach M., Van Heel M., Brimacombe R (2000) *J Mol Biol* **298**: 35-59
52. Vladimirov SN, Druzina Z, Wang R, Cooperman BS (2000) *Biochem* **39**: 183-193
53. Porse BT, Garrett RA (1995) *J Mol Biol* **249**: 1-10
54. Cundliffe R (1990) W: Hill WE, Dahlberg A, Garrett RA, Moore PB, Schlessinger D, Warner JS (red) *In The Ribosome: Structure, Function and Evolution* American Society for Microbiology, Washington DC, str. 479-490
55. Nitta I, Ueda T, Watanabe K (1998) *RNA* **4**: 257-267
56. Cech T (2000) *Science* **289**: 878-879
57. Bartel DP, Unrau PJ (1999) *TIBS* **24**: 9-13
58. Agrawal RK, Spahn CMT, Penczek P, Grassucci RA, Nierhaus KH, Frank J (2000) *J Cell Biol* **3**: 447-459

# Katalityczne DNA — deoksyrybozomy

## Catalytic DNA — deoxyribozymes

BARBARA NAWROT

*Spis treści:*

- I. Wprowadzenie
- II. Selekcja katalitycznych DNA
- III. Charakterystyka deoksyrybozymów
- IV. Mechanizm działania deoksyrybozymów
- V. Zastosowanie deoksyrybozymów do hamowania ekspresji genów
- VI. Deoksyrybozomy jako efektywne narzędzia badania struktury RNA
- VII. Potencjalne możliwości katalityczne cząsteczek DNA
- VIII. Podsumowanie, perspektywy

**Wykaz stosowanych skrótów:** BV173 — komórki chronicznej białaczki mielogenicznej, DMS 273 — komórki raka płuc, DNA — kwas deoksyrybonukleinowy, EPPS — kwas N-2-hydroksyetylopiperazyno-N'-3-propanosulfonowy, HEK 293 — komórki embrionalne ludzkiej nerki, HeLa — komórki nabłonka raka szyjki macicy, Huh7 — komórki raka wątroby, K562 — komórki chronicznej białaczki mielogenicznej, RNA — kwas rybonukleinowy, SMC — komórki mięśni gładkich, T47D — komórki raka piersi, T98G — komórki glejaka, Tris — Tris(hydroksymetyloamino)metan, TXH — komórki czerniaka, U87 — komórki astrogleja.

### I. Wprowadzenie

Przed rokiem 1980 uważano za pewne, że wyłącznie białka są odpowiedzialne za procesy katalizy enzymatycznej zachodzące w komórce, cząsteczka zaś dwuniciowego DNA, strukturalnie mało zróżnicowana, uboga funkcjonalnie spełnia wyłącznie rolę sejfu genetycznego. Taki pogląd zmienił się diametralnie, przynajmniej w stosunku do kwasów rybonukleinowych, po odkryciu katalitycznych RNA (rybozymów) [1, 2]. Wtedy stało się oczywiste, że kwasy rybonukleinowe o zdefiniowanej sekwencji i strukturze trzeciorzędowej są zdolne

*Contents:*

- I. Introduction
- II. Selection of catalytic DNA
- III. Characteristics of deoxyribozymes
- IV. Mechanism of catalytic activity of deoxyribozymes
- V. Application of deoxyribozymes for inhibition of gene expression
- VI. Deoxyribozymes as effective tools for RNA structure investigations
- VII. Catalytic ability of DNA molecules
- VIII. Summary, perspectives

do katalizowania określonych przemian chemicznych i biochemicznych. Co więcej, rozwinięta na początku lat dziewięćdziesiątych metoda selekcji kwasów nukleinowych *in vitro* [3] pozwoliła zidentyfikować kilkadziesiąt innych enzymów RNA, tzw. nowych rybozymów. Są to zdefiniowane sekwencyjnie cząsteczki RNA, zdolne do katalizy różnego rodzaju przemian chemicznych, takich jak hydroliza bądź zawiązywanie wiązania fosfodiesterowego w RNA [4, 5] i w DNA [6], fosforylacja polinukleotydów [7], aminoacylowanie RNA [8], zawiązywanie wiązania peptydowego [9-11], reakcja Dielsa-Aldera [12,13] czy metalacja porfiryn [14, 15].

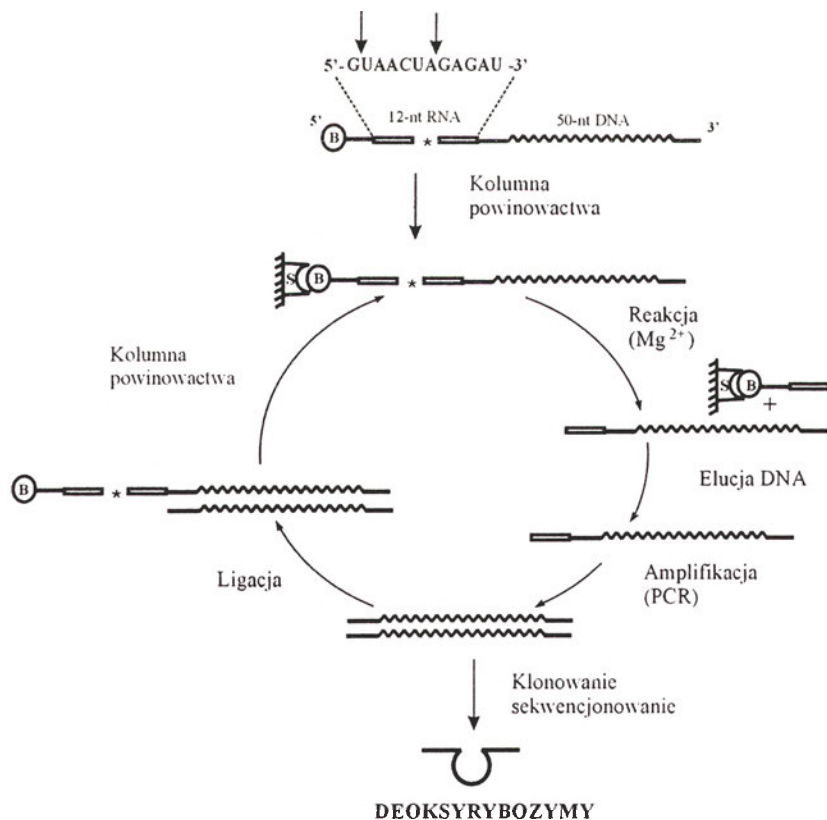
Biorąc pod uwagę wielorakość enzymatycznych właściwości RNA zadano sobie pytanie, czy jednociowe cząsteczki DNA, w przeciwieństwie do genomowego, dwuniciowego DNA, mogą odgrywać podobną rolę? Już pierwsze próby selekcji zakończyły się sukcesem. Wykazano istnienie cząsteczek DNA katalizujących hydrolizę wiązania fosfodiesterowego w substratach DNA [16, 17] i RNA [18]. Odkrycie to przyczyniło się do poszukiwania innych, aktywnych rybonukleaz oraz cząsteczek DNA ujawniających charakter katalizatorów w różnorodnych procesach chemicznych. Niniejszy przegląd literatury stanowi próbę podsumowania obecnego stanu wiedzy na temat takich właśnie katalizatorów DNA, zwanych także enzymami DNA, DNAzymami, lub deoksyrybozymami.

Dr hab.; Zakład Chemii Bioorganicznej, Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych, Polska Akademia Nauk, ul. Sienkiewicza 112, 90-363 Łódź, tel. 42-681 69 70, fax. 42-681 54 83, e-mail: bnawrot@mail.lodz.pdi.net

## II. Selekcja katalitycznych DNA

Metodą stosowaną do selekcji cząsteczek DNA o określonych, zaplanowanych właściwościach katalitycznych jest selekcja kwasów nukleinowych *in vitro* (ang. *Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment*, SELEX) [3]. Metoda ta jest przykładem chemii kombinatorycznej i polega na selekcji cząsteczek aktywnych z olbrzymiej puli ( $10^{15}$ - $10^{16}$ ) oligonukleotydów o zróżnicowanej sekwencji. Szersze omówienie wykorzystania metody selekcji *in vitro* do identyfikacji aptamerów adresowanych dla białek, kofaktorów enzymów, oraz innych niskocząsteczkowych ligandów, a także do identyfikacji katalitycznych kwasów rybonukleinowych zawarte zostało we wcześniejszych artykułach przeglądowych [19, 20].

Na Ryc. 1 przedstawiony jest przykład zastosowania metody SELEX do selekcji efektywnych enzymów DNA hydrolizujących wiązanie fosfodiesterowe w dowolnym substracie RNA, w symulowanych warunkach fizjologicznych [21].



Pulę około  $10^{14}$  oligomerów, biotynylowanych na 5' końcu i zawierających 12-nukleotydową sekwencję RNA i 3'-terminalną 50-nukleotydową zróżnicowaną (ang. *randomized*) sekwencję DNA, umieszczano na kolumnie powinowactwa, zawierającej streptawidynę. Oligonukleotydy inkubowano w bu-

forze o pH 7,5, w obecności jonów magnezu (2 mM MgCl<sub>2</sub>, 150 mM NaCl, 50 mM Tris/HCl pH 7,5, 37°C). Te warunki reakcji pozwalały na ujawnienie aktywności katalitycznej, obecnych w mieszaninie, niektórych sekwencji DNA zdolnych do katalizy reakcji autodegradacji (ang. *self-cleavage reaction*). W reakcji tej uwalniały się krótkie biotynylowane produkty cięcia oraz fragmenty DNA, które były jej katalizatorami. Z kolumny chromatograficznej eluowano cząsteczki aktywne (uwolnione oligonukleotydy), na kolumnie pozostawały zaś cząsteczki zawierające biotynę, zarówno te krótkie, będące produktami reakcji *self-cleavage*, jak i cząsteczki nieaktywne. Materiał wymyty z kolumny był powielany w reakcji PCR [22], ligowany z biotynylowaną, wyjściową sekwencją RNA, ponownie umieszczany na kolumnie powinowactwa i poddawany reakcji z kofaktorem. Po 10 cyklach selekcji otrzymano DNA, zdolne do przyśpieszania około miliona razy reakcję hydrolizy wiązania fosfodiesterowego (w porównaniu do reakcji niekatalizowanej) w dwóch różnych miejscach 12-nukleotydowej sekwencji RNA (Ryc. 1).

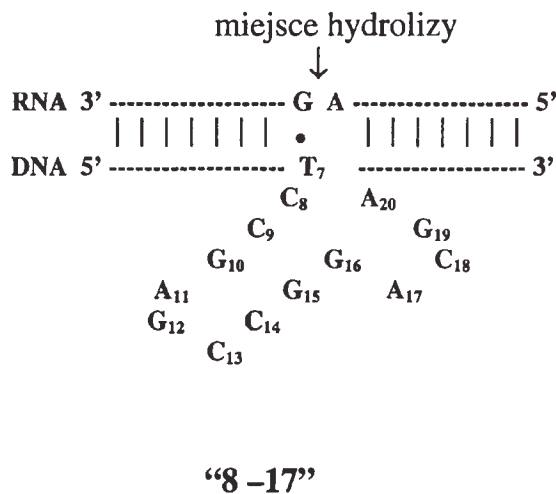
**Ryc. 1.** Selekcja cząsteczek DNA, katalizatorów hydrolizy wiązania fosfodiesterowego w substracie RNA [21]. Pulę 5'-biotynylowanych (B) oligomerów, zawierających 12-nukleotydową (12-nt) sekwencję RNA i 3'-terminalną 50-nt zróżnicowaną (ang. *randomized*) sekwencję DNA, umieszczono na kolumnie powinowactwa, zawierającej streptawidynę (S). Oligonukleotydy inkubowano w buforze o pH 7,5, w obecności jonów magnezu (2 mM MgCl<sub>2</sub>, 150 mM NaCl, 50 mM Tris/HCl pH 7,5, 37°C). Biotynylowane produkty reakcji *self-cleavage* oraz cząsteczki nieaktywne pozostawały na kolumnie zaś cząsteczki DNA, które były katalizatorami reakcji hydrolizy, eluowano z kolumny i powielano w reakcji PCR [22]. Wzbogaconą pulę katalizatorów ligowano z biotynylowaną, wyjściową sekwencją RNA, ponownie umieszczano na kolumnie powinowactwa i poddawano reakcji z kofaktorem. Po kilku cyklach selekcji zidentyfikowano aktywne cząsteczki DNA (deoksyrybozymy), zdolne do przyśpieszania około miliona razy reakcji hydrolizy wiązania fosfodiesterowego (w porównaniu do reakcji niekatalizowanej) w dwóch różnych miejscach 12-nt sekwencji RNA.

Z 62 sklonowanych sekwencji enzymów DNA najbardziej aktywne okazały się dwa motywy katalityczne — motyw „10-23” i motyw „8-17” (Ryc. 2). Oznaczenia te pochodzą od aktywnego klonu 23 wyodrębnionego po 10 cyklach selekcji i aktywnego klonu 17 wyselekcjonowanego po 8 cyklach selekcji.

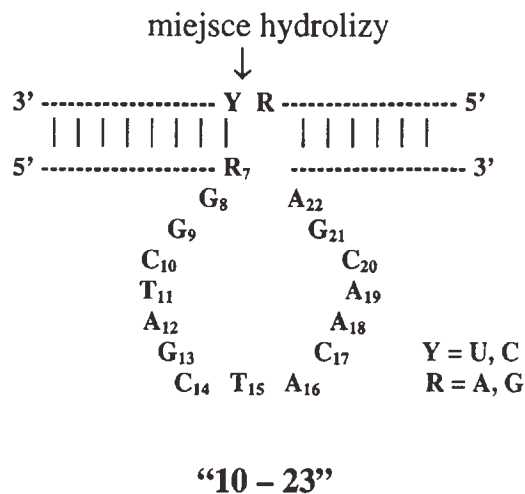
### III. Charakterystyka deoksyrybozymów „10-23” i „8-17”

#### III-1. Struktura deoksyrybozymów

Deoksyrybozomy, podobnie jak rybozomy, zawierają dwie domeny funkcjonalne: zmienną rozpoznania substratu i konserwatywną, zawierającą centrum katalityczne (Ryc. 2) [21]. Struktura domeny katalitycznej obu enzymów DNA jest różna. Enzym



Dodatek krótkich oligomerów DNA, komplementarnych do sekwencji substratu na zewnątrz domeny rozpoznania zwiększa do 200 razy aktywność katalityczną deoksyrybozomu „10-23” [23]. Wykazano także, że zamiana regionów wiążących substratu RNA na homologiczne DNA zwiększa szybkość reakcji hydrolizy wiązania internukleotydu w chimerycznym substracie 5'-DNA-GpC-DNA-3' (GpC jest dimerem rybonukleotydu) [24]. Istnieje sugestia, że zwiększenie charakteru formy



Ryc. 2. Struktura deoksyrybozymów „10-23” i „8-17” [21]. Deoksyrybozomy zawierają dwie funkcjonalne domeny: zmienną rozpoznania substratu i konserwatywną, zawierającą centrum katalityczne. Domena katalityczna enzymu „8-17” zbudowana jest z 9-nukleotydujowej sekwencji o strukturze spinki do włosów (typu *hairpin*) i jednoniciowej sekwencji 5'-ACGA-3'. Trzon spinki zawiera trzy pary zasad, z czego dwie muszą być parami G-C. Tuż za miejscem hydrolizy łańcucha substratu występuje para G-T typu *wobble*. Enzym „10-23” zawiera konserwatywną 15-nukleotydujową domenę katalityczną. Domena rozpoznania substratu w obu deoksyrybozymach składa się z dwóch ramion komplementarnych do sekwencji substratu. Miejsce hydrolizy wiązania fosfodiesterowego w RNA wskazane jest strzałką. Enzym „8-17” hydrolizuje wiązanie internukleotydu pomiędzy nukleozydami purynowymi, 5'-A i 3'-G, zaś enzym „10-23” pomiędzy 5'-nukleozydem purynowym (R) i 3'-nukleozydem pirymidynowym (Y).

„8-17” zawiera 9-nukleotydujową sekwencję o strukturze spinki do włosów (typu *hairpin*) oraz 4-nukleotydujową sekwencję jednoniciową. Trzon spinki zawiera trzy pary zasad, z czego dwie muszą być parami G-C. Dodatkowym istotnym wymaganiem sekwencyjnym enzymu „8-17” jest wystąpienie pary G-T typu *wobble* tuż za miejscem hydrolizy łańcucha substratu. Mutacja pary G-T na parę typu Watsona - Cricka G-C całkowicie niweluje aktywność katalityczną deoksyrybozomu. Enzym „10-23” zawiera konserwatywną 15-nukleotydujową domenę katalityczną. Zamiana G13 na A13 całkowicie niweluje aktywność deoksyrybozomu. Wykazano, że jedynie pozycja piętnasta toleruje pewną zmienność, jednak spośród trzech możliwych nukleotydów T, C lub A, enzym zawierający tymidynę charakteryzował się najwyższą aktywnością katalityczną. Domena rozpoznania substratu w obu deoksyrybozymach zawiera dwa ramiona komplementarne do sekwencji substratu. Wykazano, że optymalna długość każdego z ramion wynosi od 7 do 10 nukleotydów [21, 23, 25].

B-DNA dwuniciowej helisy substrat / enzym jest odpowiedzialne za wzrost aktywności katalitycznej deoksyrybozymów.

#### III-2. Specyficzność substratowa

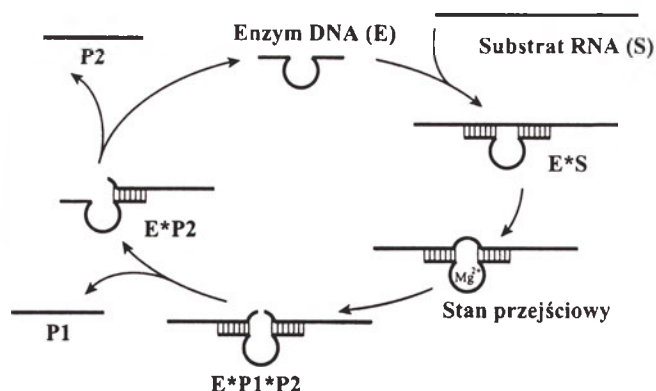
Deoksyrybozomy „10-23” i „8-17” hydrolizują wiązanie fosfodiesterowe w prawie każdym substracie RNA w symulowanych warunkach fizjologicznych, rozpoznając komplementarny substrat RNA poprzez wiązania typu Watsona-Cricka [21, 25]. Enzym „8-17” hydrolizuje wiązanie internukleotydu pomiędzy nukleozydami purynowymi, 5'-A i 3'-G, zaś enzym „10-23” pomiędzy 5'-nukleozydem purynowym i 3'-nukleozydem pirymidynowym (preferencyjnie pomiędzy G i U oraz A i U) [25]. Produktami reakcji są: oligonukleotyd 5'-końcowy zawierający 2',3'-cykliczny fosforan oraz oligonukleotyd 3'-końcowy z wolną grupą 5'-hydroksylową. Sekwencja ramion rozpoznania substratu jest dowolna pod warunkiem zachowania komplementarności z



ramionami deoksyrybozumu. Pojedyncze pary niekomplementarne (ang. *mismatches*) w duplekcie RNA / DNA powodują znaczne obniżenie efektywności katalitycznej enzymów [25]. Tak więc obydwa deoksyrybozomy, „8-17” i „10-23”, *a priori* mogą być uniwersalnymi katalizatorami hydrolizy wiązania internukleotydu w prawie każdym substracie RNA.

### III-3. Efektywność katalityczna deoksyrybozumu „10-23”

Parametry kinetyczne enzymu „10-23” wyznaczono badając degradację wiązania internukleotydu pomiędzy A i U w kodonie startu AUG mRNA białka *gag/pol* wirusa HIV-1 [21]. Siedemnastonukleotydowy RNA, odpowiadający początkowej sekwencji translacji (5'-<sup>32</sup>P GGAGAGAGA\*UG-GGUGCG-3') poddany był katalitycznej degradacji deoksyrybozymem „10-23” w warunkach wielokrotnego obrotu. Szybkość katalizy ( $k_{kat}$ ) wynosiła w zależności od warunków reakcji, od 0.15 min<sup>-1</sup> (2 mM MgCl<sub>2</sub>, 150 mM NaCl, pH 7.5, 37 °C) do 3.4 min<sup>-1</sup> (50 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 8.0, 37 °C). Wartości te okazały się znacznie mniejsze w porównaniu do  $k_{kat}$  rybonukleazy A (8.4 x 10<sup>4</sup> min<sup>-1</sup> dla substratu UpA) [27]. Jednakże powinowactwo oligomerów DNA do substratów RNA (tworzenie kompleksu E\*S, Ryc. 3) jest pięć rzędów wielkości wyższe niż odpowiednie wartości  $K_M$  dla enzymów białkowych wiążących RNA ( $K_M$  poli(C) do rybonukleazy A wynosi 3.4 x 10<sup>-5</sup> M) [21, 27]. Tak więc efektywność katalityczna ( $k_{kat}/K_M$ ) deoksyrybozymów w stosunku do substratów RNA, mierzona zarówno w warunkach pojedynczego, jak i wielokrotnego obrotu, jest wyższa niż efektywność katalityczna enzymów białkowych oraz rybozymów typu *hammerhead* i *hairpin* (Tabe-



Ryc. 3. Cykl katalityczny enzymów DNA degradujących substrat RNA [26]. Diagram jest propozycją schematycznego przedstawienia cyklu katalitycznego dla małych cząsteczek kwasów nukleinowych, takich jak rybozomy typu *hammerhead* i deoksyrybozomy, które wiążą substrat RNA poprzez oddziaływania Watsona-Cricka. Pierwszym etapem cyklu jest rozpoznanie przez ramiona enzymu komplementarnej sekwencji substratu i utworzenie kompleksu enzym-substrat (E\*S). Centrum katalityczne takiego kompleksu przyjmuje aktywną konformację, która zapewnia właściwe usytuowanie kofaktora (Mg<sup>2+</sup>) względem substratu. W stanie przejściowym następuje reakcja hydrolizy wiązania fosfodiesterowego w cząsteczce RNA. Wytworzony kompleks enzym-produkt (E\*P1\*P2) ulega reasocjacji, uwalniając produkty P1 i P2 oraz cząsteczkę wolnego enzymu, gotowego do następnego cyklu reakcji katalizy.

la 1). Wartość  $k_{kat}/K_M$  dla deoksyrybozumu „10-23” wynosi około 4.5 x 10<sup>9</sup> M<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup>. Deoksyrybozomy typu „8-17” wykazują nieznacznie niższą aktywność w porównaniu z deoksyrybozymami „10-23”.

Etapem ograniczającym szybkość reakcji hydrolizy wiązania fosfodiesterowego w warunkach wielokrotnego obrotu jest etap tworzenia kompleksu E\*S a nie etap uwalniania produktów z odpowiedniego kompleksu z deoksyrybozymem (E\*P1\*P2) (Ryc. 3) [25]. Zależne od długości i sekwencji ramion rozpoznania substratu termodynamiczne parametry hete-

Tabela 1

Katalityczna aktywność enzymów degradujących wiązanie internukleotydu w substratach RNA [21].

Enzym	$k_{kat}$ , min <sup>-1</sup>	$K_M$ , M	$k_{kat} / K_M$ (M <sup>-1</sup> x min <sup>-1</sup> )
Rybonukleaza A			
Substrat UpA	8.4 x 10 <sup>4</sup>	6.2 x 10 <sup>-4</sup>	1.4 x 10 <sup>8</sup>
Substrat poli(C)	3.1 x 10 <sup>4</sup>	3.4 x 10 <sup>-5</sup>	9.0 x 10 <sup>8</sup>
Rybozym typu <i>hairpin</i>	2.1	2.8 x 10 <sup>-8</sup>	7.5 x 10 <sup>7</sup>
Rybozym typu <i>hammerhead</i>	1.4	4.9 x 10 <sup>-8</sup>	2.9 x 10 <sup>7</sup>
Enzym DNA „10-23”	3.4	7.6 x 10 <sup>-10</sup>	4.5 x 10 <sup>9</sup>

rodupleksów DNA / RNA określają wartość powinowactwa ( $K_M$ ) deoksyrybozymów do RNA. W Tabeli 2 pokazane są wartości kinetyczne Michaelisa-Menten dla kompleksów deoksyrybozymu

na aktywność deoksyrybozymów w sposób zbliżony. Wyjątkiem jest jon kadmu, który w obecności Tris/HCl okazał się znacznie bardziej aktywny niż w buforze EPPS.

**Tabela 2**

Charakterystyka aktywności deoksyrybozymów „10-23” degradujących wiązanie fosfodiesterowe w sekwencjach początkowego regionu translacji białek wirusa HIV-1 [21].

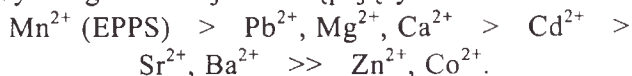
Białko	Sekwencja docelowa	Długość ramion enzymu	$k_{kai}$ , min <sup>-1</sup>	$K_M$ , mM
<i>gag/pol</i>	(G)GAGAGAGA•UGGGUGC(G)	7 + 7	0.10	0.9
		8 + 8	0.10	0.7
<i>env</i>	(C)AGUGGCAA•UGAGAGU(G)	7 + 7	0.03	900
		8 + 8	0.04	9
<i>vpr</i>	(G)AGGAUAGA•UGGAACA(A)	7 + 7	0.08	500
		8 + 8	0.10	20
<i>tat</i>	GCAAGAAA•UGGAGCC	7 + 7	0.04	300
<i>nef</i>	CUAUAAGA•UGGGUGA	7 + 7	0.05	900

„10-23” z oligorybonukleotydami początkowej sekwencji translacji białek wirusa HIV-1 (*gag / pol*, *env*, *vpr*, *tat* i *nef*) w zależności od długości ramion deoksyrybozymu (7+7 lub 8+8). Wykazano, że dalsze wydłużanie ramion rozpoznania enzymu powoduje obniżenie szybkości dysocjacji produktów z ich kompleksu z deoksyrybozymem [21, 29]. W warunkach pojedynczego obrotu, przy dużym nadmiarze enzymu wobec substratu, etapem limitującym szybkość katalizy ( $k_{kai}$ ) jest etap chemiczny (reakcji transestryfikacji zachodzącej na atomie fosforu z udziałem grupy 2'-OH), a nie etapy tworzenia kompleksu substrat / enzym (E\*S) czy też etap uwalniania produktów z kompleksu z deoksyrybozymem [24, 25].

#### III-4. Zależność aktywności deoksyrybozymów od kationu metalu i pH środowiska reakcji

Podobnie jak większość rybozymów, deoksyrybozymy „8-17” i „10-23” są metaloenzymami. Wykazano, że ich aktywność zależy od charakteru jonu metalu dwuwartościowego, zastosowanego buforu oraz jego pH [25]. W warunkach pojedynczego obrotu w buforze EPPS (pH 7.5) najlepszym kofaktorem reakcji enzymatycznej jest jon  $Mn^{2+}$ , jednakże jego aktywność jest niewielka w buforze Tris/HCl. Pozostałe kationy ( $Pb^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Sr^{2+}$ ,  $Ba^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$  i  $Co^{2+}$ ), bez względu na zastosowany bufor, wpływają

Szereg kofaktorów według zmniejszającej się aktywności deoksyrybozymów w warunkach pojedynczego obrotu jest następujący:



W warunkach wielokrotnego obrotu aktywność deoksyrybozymów jest zbliżona w obecności jonów  $Mg^{2+}$  i  $Ca^{2+}$ , jednakże obniżona do połowy w obecności jonów  $Mn^{2+}$ .

Aktywność deoksyrybozymu „10-23” zależy od pH. Badania prowadzone w trzech różnych buforach w granicach pH od 6.1 to 9.7, w warunkach pojedynczego obrotu ( $k_{obs} = k_{kai}$ ), w obecności 10 mM  $Ca^{2+}$ , w 37 °C wykazały, że jedynie dla wartości pH w zakresie od 6.5 do 8.5 wartość  $\log k_{kai}$  zmienia się liniowo, z kątem nachylenia prostej 0.94 [25]. W tym zakresie stężeń jonów wodorowych szybkość reakcji hydrolizy wiązania fosfodiesterowego jest etapem limitującym całkowitą szybkość reakcji. Większość reakcji degradacji substratów RNA za pomocą deoksyrybozymów przeprowadzana jest w optymalnym pH w zakresie 7.5-8.0.

#### IV. Mechanizm działania deoksyrybozymów

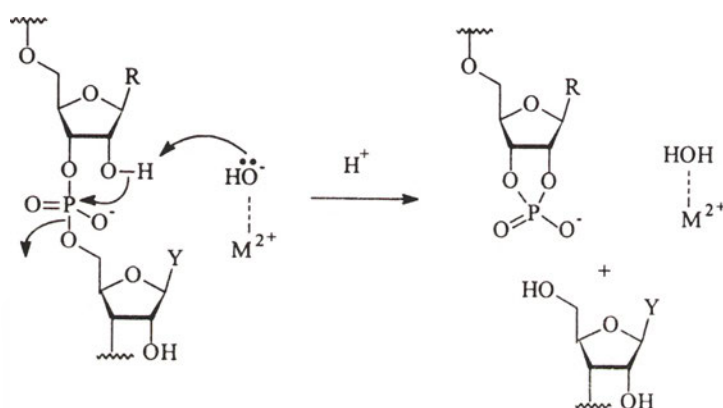
Podobnie jak w przypadku rybozymów typu *hammerhead*, szybkość reakcji degradacji wiązania fosfodiesterowego przez enzym „10-23” jest zależna zarówno od obecności dwuwartościowego kationu me-

talujak i od pH roztworu [25]. Te parametry sugerują mechanizm hydrolizy wiązania fosfodiesterowego poprzez katalizowaną jonem metalu deprotonację grupy 2'-hydroksylowej nukleozydu, znajdującego się w sąsiedztwie reaktywnej grupy fosforanowej. Wytworzony anion alkoholowy w pozycji 2' atakuje atom fosforu wiązania internukleotydu z jednoczesnym rozerwaniem wiązania P-O5'. Formalnie jest to więc reakcja transestryfikacji grupy fosfodiesterowej pomiędzy grupą 5'-OH i 2'-OH. W wyniku reakcji tworzą się dwa produkty: 2',3'-cykliczny fosforan oligonukleotydu 5'-końcowego i oligonukleotyd 3'-końcowy z wolną grupą 5'-OH (Schemat 1).

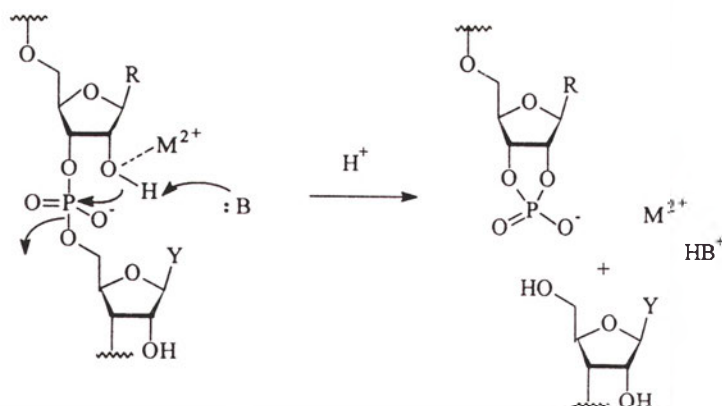
mechanizmu katalizy kwasowo — zasadowej [30]. Potwierdzają to zarówno eksperymenty selekcji deoksyrybozemu aktywnego wobec L-histydyny [31] jak i deoksyrybozemu aktywnego bez kofaktora [32]. W tym ostatnim przypadku funkcję katalizatora mogą spełniać komponenty kwasów nukleinowych (np. atomy azotu zasad heterocyklicznych), podobnie jak w mechanizmie działania rybozemu delta [33] czy transferazy peptydylowej [34]. Jon metalu, podobnie jak w większości rybozymów, może spełniać także rolę jonu stabilizującego strukturę helikalną dupleksu substrat/enzym [35].

Podjęto próbę uzyskania struktury krystalicznej kompleksu deoksyrybozemu „10-23” — substrat

**A**



**B**

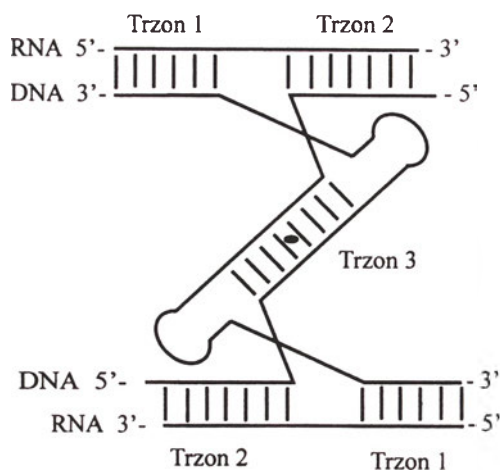


**Schemat 1.** Proponowany mechanizm hydrolizy wiązania fosfodiesterowego w substratach RNA za pomocą deoksyrybozymów [25, 30]. A) mechanizm katalizy kwasowo-zasadowej, z udziałem cząsteczki wody skoordynowanej z jonem metalu oraz B) mechanizm katalizy kwasowej, w której jon metalu, jako kwas Lewisa, koordynuje atom tlenu grupy 2'-OH i zwiększa kwasowość atomu wodoru.

Rozważane są dwa mechanizmy katalizy hydrolizy wiązania fosfodiesterowego za pomocą deoksyrybozymów — mechanizm katalizy zasadowej, z udziałem cząsteczki wody skoordynowanej z jonem metalu — kofaktorem deoksyrybozemu (Schemat 1a) oraz mechanizm katalizy kwasowej, w której jon metalu, jako kwas Lewisa, koordynuje atom tlenu grupy 2'-OH i zwiększa kwasowość atomu wodoru (Schemat 1b) [25]. Obecnie wydaje się, że reakcja transestryfikacji katalizowana jest według ogólnego

RNA [36]. Równomolową ilość 13-nukleotydu modyfikowanego substratu RNA, zawierającego 2'-OMe adenozyne na 5'-końcu hydrolizowanego wiązania fosfodiesterowego, krystalizowano z DNA zawierającym 6-nukleotydu ramiona rozpoznania substratu i 15-nukleotydu domenę katalityczną. Badania strukturalne wykazały istnienie czteroniowej struktury zawierającej dwie nici DNA i dwie nici RNA, o charakterystycznym złączeniu typu Hollidaya (Ryc. 4). Otrzymana struktura nie reprezentuje

katalitycznie aktywnej konformacji enzymu DNA z jego substratem RNA i nie pogłębia wiedzy na temat mechanizmu działania deoksyrybozymów [36].



**Ryc. 4.** Drugorzędowa struktura krystalicznego kompleksu dwóch cząsteczek deoksyrybozymu z dwoma cząsteczkami stabilnego substratu RNA [36]. Sześć nukleotydów 5'-końcowej sekwencji RNA wiąże się do jednej cząsteczki DNA (trzon 1), zaś siedem nukleotydów 3'-końca RNA wiąże się do drugiej cząsteczki DNA (trzon 2). Obie cząsteczki DNA tworzą także helikalny dupleks DNA / DNA (trzon 3), który zawiera sześć par zasad typu Watsona-Cricka utworzonych przez palindromiczną sekwencję centrum aktywnego 5'-GCTAGC-3'. Pośrodku trzonu 3 zaznaczona jest dwukrotna oś symetrii cząsteczki, prostopadła do płaszczyzny ryciny.

## V. Zastosowanie deoksyrybozymów „10-23” do hamowania ekspresji genów

Zdolność deoksyrybozymu „10-23” do specyficznej hydrolizy wiązania internukleotydowego w RNA, z wysoką wydajnością i w symulowanych warunkach fizjologicznych sprawiła, że ten enzym DNA stał się jest potencjalnym narzędziem molekularnym w aplikacjach biologicznych. Enzymy takie mogą być traktowane jako restrykcyjne endonukleazy oraz jako efektywne nukleazy zaprojektowane na hamowanie ekspresji genów niechcianych białek na poziomie mRNA. Od kilku lat ukazują się doniesienia o skutecznym zastosowaniu deoksyrybozymu „10-23” w różnorodnych układach biologicznych, z których niektóre przykłady omówione są poniżej (Tabela 3).

### V-1. Deoksyrybozimy skierowane na hamowanie ekspresji genu *bcr-abl*

Chroniczna białaczka szpikowa (*chronic myelogenous leukemia*, CML) spowodowana jest wadliwą translokacją genów, prowadzącą do utworzenia chromosomu typu Filadelfia zawierającego fuzyjny gen *bcr-abl*. Gen ten koduje dwa patogeniczne mRNA (b2a2

i b3a2). Dwie grupy badaczy (W a r a s h i n a i inni [37] oraz W u i inni [38]) prowadziły badania aktywności deoksyrybozymów „10-23” komplementarnych do mRNA białka *BCR-ABL* (Ryc. 5). W oparciu o geny fuzyjne, zawierające gen *bcr-abl* i gen reporterowy lucyferazy, badano wewnątrzkomórkową aktywność deoksyrybozymów w komórkach HeLa. W badaniach tych obserwowano 99 % inhibicję ekspresji genu lucyferazy. Aktywność deoksyrybozymów wykazano również w układach *in vivo*, badając ekspresję endogennego genu *bcr-abl* w komórkach pobranych od pacjentów z chroniczną białaczką szpikową (BV173 [37] oraz w komórkach K562 i CD34<sup>+</sup>[38]). W celu zwiększenia odporności na degradację nukleolityczną do cząsteczek deoksyrybozymów wprowadzono odpowiednie modyfikacje. Zastosowano tutaj modyfikację 2'-OME dla końcowych nukleotydów lub zmodyfikowano skrajne wiązania fosforanowe oligonukleotydu wiązaniem tiofosforanowym (PS) (Ryc. 6). Deoksyrybozimy 2'OME okazały się wysoce specyficzne w inaktywacji genu *bcr-abl*, prowadząc do apoptozy komórek BV173. Jednakże deoksyrybozimy PS w tym przypadku hamowały ekspresję zarówno mutagenego *bcr-abl* jak i normalnego genu *abl* [37]. W badaniach inhibicji ekspresji *bcr-abl* w komórkach K562 z zastosowaniem deoksyrybozymów tiofosforanowych wykazano, że zmiana długości ramion rozpoznania substratu (12/6) prowadzi do 40 % supresji biosyntezy patogenicznego białka i obniża wzrost komórek o ponad 50% [38]. W obydwu laboratoriach wykazano wyższą aktywność i specyficzność deoksyrybozymów w porównaniu do inhibitorowych właściwości oligonukleotydów antysensowych, jak i do rybozymów typu *hammerhead* [39].

### V-2. Deoksyrybozimy dla HIV-1

Przeprowadzone przez Santoro i Joyce'a pionierskie badania aktywności deoksyrybozymów oparte były na krótkich substratach RNA, odpowiadających mRNA białek wirusa HIV-1 (*gag/pol*, *env*, *vpr*, *tat* i *nef*) (Tabela 2) [25]. Aktywność deoksyrybozymów *in vitro* została potwierdzona w warunkach *in vivo* dla genu białka *env* [40]. Deoksyrybozimy skierowane na pętlę V3 genu tego białka prowadziły do supresji replikacji wirusa i zahamowania infekcji. Inhibicję ekspresji genu białka *env* obserwowano także w układzie fuzyjnym z białkiem membranowym chemokiny CD4 w transfekowanych komórkach HeLa [41]. Badana była aktywność deoksyrybozymów skierowanych na jednoniciową sekwencję PBS (ang. *primer binding site*) wirusowego

**Tabela 3**

Zastosowanie deoksyrybozymów „10-23” do hamowania ekspresji genów.

Geny białek	Linia komórkowa	Aktywność enzymu DNA	Piśmiennictwo
<i>bcr-abl</i> – lucyferaza	HeLa	99% supresja biosyntezy lucyferazy w genie fuzyjnym z <i>bcr-abl</i>	[37]
<i>bcr-abl</i>	BV173	Morfologia apoptyczna komórek	[37]
<i>bcr-abl</i>	K562	40 % supresja produkcji białka, 50 % obniżenie podziału komórkowego	[38]
<i>bcr-abl</i>	Komórki szpiku kostnego w CML	hamowanie wzrostu komórek (53 % - 80 %)	[38]
HIV-1 <i>env</i>	U87	77 – 81 % supresja syntezy białka p24	[40]
HIV-1 <i>env</i>	HeLa	50 % hamowanie syntezy białka fuzyjnego chemokiny CD4	[41]
HIV-1 PBS	Sarcoma CD4+, infekowane NL432	64 % supresja syntezy białka p24	[44]
CCR5	HeLa	70 % inhibicja ekspresji białka	[45]
CXCR-4	HeLa	80 % supresja biosyntezy lucyferazy w genie fuzyjnym z CXCR-4	[46]
Kinaza białkowa Cα (PKCα)	T98G	80 % inhibicja biosyntezy PKCα	[52]
Kinaza białkowa Cα (PKCα)	T47D, DMS 273, THX, T98G	Zahamowanie proliferacji komórek nowotworowych	[52]
<i>c-myc</i>	SMC	80 % supresja proliferacji komórek	[53]
<i>Egr-1</i>	SMC	75 % supresja proliferacji komórek	[55]
HBV	Huh 7	50 % supresja aktywności lucyferazy w genie fuzyjnym z Hbc/c	[56]
Huntingtina	HEK 293	85 % zahamowanie ekspresji genu	[57]

RNA, zarówno w warunkach *in vitro* jak i w systemie komórkowym (komórki *Sarcoma* CD4+ infekowane szczepem NL432 HIV-1) [44]. Jeden z zaprojektowanych deoksyrybozymów hamował ekspresję białka p24 w ponad 60%.

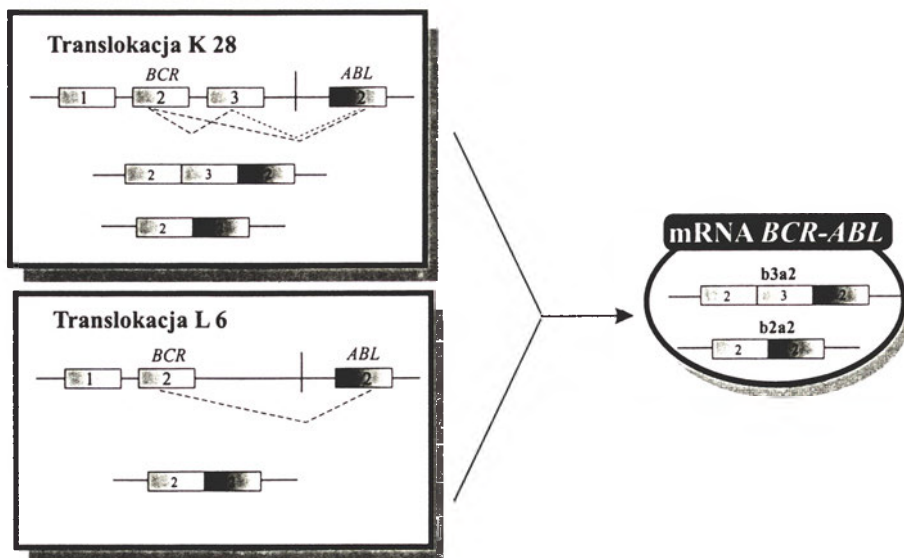
Koreceptory wirusa HIV-1, chemokiny CXCR-4 i CCR5, konieczne do fuzji wirusa z komórką gospodarza, są atrakcyjnymi białkami docelowymi dla potencjalnych terapeutów. Deoksyrybozymy skierowane na mRNA białka CCR5 w testach *in vitro* były bardziej aktywne niż rybozymy typu *hammerhead* (skierowane na inną sekwencję tego samego mRNA) i hamowały ekspresję w ponad 70% [45]. Wykazano także skuteczną inhibicję ekspresji obu białek koreceptorowych CCR5 i CXCR-4 za pomocą 58-nukleotydowego DNA zawierającego jednocześnie dwa deoksyrybozymy, komplementarne do poszczególnych substratów [46]. W obu przypadkach obniżenie ekspresji białek koreceptorowych za pomocą specyficz-

nych deoksyrybozymów prowadziło do zahamowania infekcji wirusowej [45, 46].

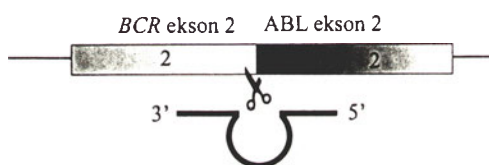
### V-3. Inne przykłady zastosowania deoksyrybozymów „10-23”

W niektórych komórkach nowotworowych obserwowana jest nadekspresja izomorficznej formy Cα kinazy białkowej (PKCα) [47]. Prowadzone są liczne badania w poszukiwaniu efektywnych inhibitorów ekspresji genu PKCα z wykorzystaniem oligonukleotydów antysensowych [48-50] i rybozymów [51]. Ostatnio wykazano również, że modyfikowany deoksyrybozym „10-23” skutecznie (80%) hamuje biosyntezę PKCα w komórkach T98G (komórki ludzkiego nowotworu mózgu) i proliferację nowotworowych komórek T47D, DMS 273, THX oraz T98G [52]. Użyta w tych badaniach modyfikacja polegała na wprowadzeniu wiązań tiofosforanowych

A



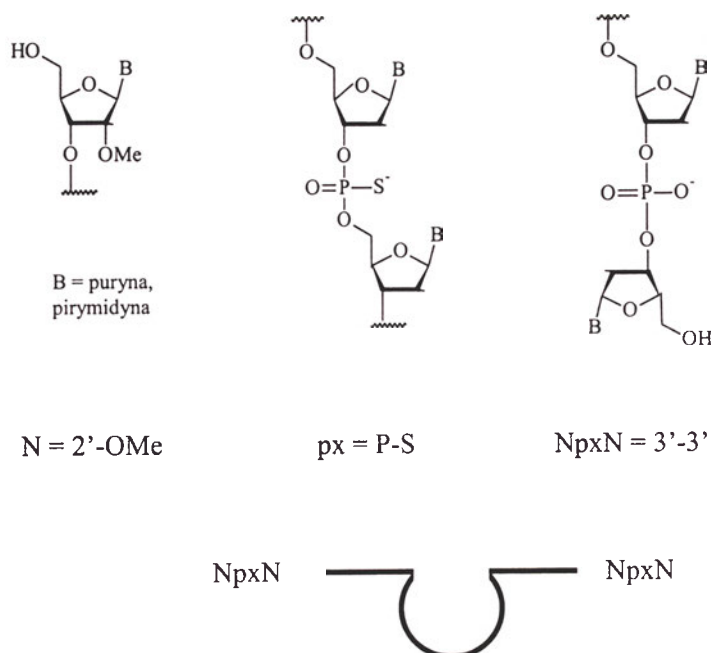
B



Ryc. 5. A) Translokacje genowe prowadzące do fuzyjnego genu *bcr-abl* (mRNA b2a2 i b3a2); B) Zaprojektowane enzymy DNA były komplementarne do 3'-końcowej sekwencji eksonu b2 genu *bcr* i do 5'-końcowej sekwencji eksonu a2 genu *abl* [37].

zarówno do domeny rozpoznania substratu jak i po każdym nukleozydzie pirymidynowym w centrum katalitycznym deoksyrybozemu. Tak modyfikowany deoksyrybozym okazał się wyjątkowo stabilny w

ludzkim osoczu ( $T_{1/2} = 90$  h) i stosunkowo aktywny ( $k_{kat} = 0.01 \text{ min}^{-1}$ ) w porównaniu z deoksyrybozmem niemodyfikowanym ( $T_{1/2} = 2$  h i  $k_{kat} = 0.11 \text{ min}^{-1}$ ).



Ryc. 6. Modyfikacje nukleozydów i wiązania internukleotydydowego w enzymach DNA zwiększające ich odporność na degradację nukleolityczną [37, 38, 53].

Wewnątrzkomórkową aktywność deoksyrybozymów skierowanych na mRNA białka *c-myc* przedstawiono w oparciu o badania proliferacji szczyrczych komórek mięśni gładkich (SMC) [53]. Najbardziej efektywnym enzymem był deoksyrybozym zawierający po 9 nukleotydów w ramionach rozpoznania substratu i stabilizowany terminalną modyfikacją wiązania internukleotydowego typu 3'-3' (Ryc. 6) ( $T_{1/2} = 24$  h). Użyty deoksyrybozym wykazywał 80% zahamowanie proliferacji komórek SMC ( $IC_{50} = 50$  nM), podczas gdy skierowany na tę samą sekwencję antysensowy oligonukleotyd tiofosforanowy użyty aż w 20-krotnie wyższym stężeniu prowadził do 70% supresji podziału komórkowego [54].

Wykazano także skuteczność deoksyrybozymów w stosunku do fatora transkrypcyjnego Egr-1 [55]. W badaniach tych określano stopień proliferacji komórek mięśni gładkich w kulturach komórkowych jak i w gojeniu się ran u szczura po zabiegu angioplastii. Jest to pierwsze doniesienie o aktywności deoksyrybozymów w warunkach *in vivo*, tym bardziej istotne, że efektywne inhibitory biosyntezy białka Egr-1 mogą okazać się bardzo przydatnymi terapeutykami w leczeniu schorzeń serca takich jak np. zwężenie naczyń wieńcowych.

Deoksyrybozyny zastosowano także do badań *in vitro* inhibicji ekspresji genów fuzyjnych białek wirusa żółtaczkowego typu B (HBV) z lucyferazą [56]. Wykazano zależność aktywności deoksyrybozymów i ich trwałości w medium komórkowym od ilości wprowadzonych wiązań tiofosforanowych. Deoksyrybozyny modyfikowane w domenie katalitycznej charakteryzowały się znacznie obniżoną aktywnością, zaś zawierające modyfikowane ramiona rozpoznania substratu słabiej wiązały się do komplementarnego RNA. Najwyższą aktywność w stosunku do sekwencji białek antygenowych HBe i HBc wykazywały deoksyrybozyny chronione na obu końcach pojedynczym wiązaniem tiofosforanowym (Ryc. 6).

Aktywność enzymu „10-23” demonstrowano w stosunku do mRNA białka huntingtyny [57]. Mutacja w genie huntingtyny, spowodowana pojawianiem się powtórzeń CAG i powiększeniem domeny poliglutaminowej w produkcie translacji, jest przyczyną zespołu zaburzeń neurodegeneratywnych, znanych pod nazwą choroby Huntingtona. Niestety, deoksyrybozyny skierowane na sekwencje poli(CAG) okazały się nieaktywne. Tym niemniej wykazano, że dwa inne deoksyrybozyny, skierowane na heterogenne sekwencje mRNA huntingtyny, w warunkach *in vitro* prowadziły do efektywnej degradacji docelowego RNA. Poziom białka w transfekowanych genem huntingtyny komórkach HeLa był obniżony, z obserwo-

wanym efektem synergicznym po równoczesnym podaniu obu deoksyrybozymów.

## VI. Deoksyrybozyny „10-23” jako efektywne narzędzia do badania struktury RNA

W każdej strategii hamowania ekspresji genu na poziomie mRNA za pomocą oligonukleotydów, (strategii antysensowej, strategii rybozymowej, jak i przedstawionej w niniejszym przeglądzie strategii deoksyrybozymowej) niezwykle istotnym problemem jest dostępność sekwencji docelowej substratu RNA dla utworzenia wiązań typu Watsona-Cricka z częścią inhibitora. Aktywność deoksyrybozymów *in vitro* badana na krótkich substratach RNA nie gwarantuje ich aktywności w długich transkryptach RNA oraz w systemach *in vivo*, właśnie ze względu na drugorzędową strukturę cząsteczek mRNA. Dotychczas stosowano różnego rodzaju techniki przeszukiwania (ang. *screening*) całego mRNA, np. za pomocą oligonukleotydów antysensowych, aktywacji RNazy-H, zdegenerowanych bibliotek oligonukleotydowych zawierających katalityczną domenę rybozymu, i innych podejść, w celu identyfikacji sekwencji dostępnych dla tworzenia struktur dwuniciowych z komplementarnym oligonukleotydem [58]. Ostatnio opracowano kompleksową metodę przeszukiwania dużych cząsteczek RNA za pomocą zestawu deoksyrybozymów zaprojektowanych dla całej długości sekwencji docelowej [58]. Produkty degradacji identyfikowano metodą wydłużania primerów i sekwencjonowania otrzymanych fragmentów. I tak np. modelowy gen ludzkiego wirusa papilloma (HPV 16 E6) degradowano 80 różnymi deoksyrybozymami użytymi w stężeniach od 0.5 do 50 nM. W wyższych stężeniach enzymów (warunki pojedynczego obrotu) zidentyfikowano całą gamę produktów degradacji badanego RNA. Obniżając stężenie deoksyrybozymów do 5 nM (warunki wielokrotnego obrotu) zidentyfikowano jedynie 8 deoksyrybozymów wykazujących znaczącą aktywność. Kilka z tych enzymów skierowanych było na wspólną sekwencję docelową, prawdopodobnie stanowiącą fragment motywu pętla-trzon lub jednociowego wybrzuszenia w drugorzędowej strukturze RNA. Metoda ta pozwoliła zlokalizować dostępne dla degradacji sekwencje mRNA wirusa HPV.

W tym samym zespole, również w oparciu o strategię deoksyrybozymową, badano występowanie mutacji (ang. *mismatches*) w obrębie długich sekwencji substratu RNA [59]. W tym celu otrzymano biblioteki deoksyrybozymów zawierających jedno ramię sekwencyjnie komplementarne do substratu

RNA (gen L1 HPV), zaś drugie ramię sekwencyjnie zdegenerowane. W metodzie tej badano aktywność deoksyrybozymów w stosunku do substratu natywnego i jego form zmutowanych. Połączenie metody amplifikacji (PCR) i analizy sekwencyjnej produktów degradacji pozwoliło wykryć pojedyncze mutacje w genie. Metoda ta tym samym staje się narzędziem do badania mutacji genowych, w tym szczególnie pojedynczych mutacji genowych (ang. *single nucleotide polymorphism*, SNP).

## VII. Potencjalne możliwości katalityczne cząsteczek DNA

W licznych badaniach selekcji kwasów nukleinowych *in vitro* wykazano istnienie cząsteczek DNA katalizujących szeroki wachlarz przemian chemicznych (Tabela 4). I tak, wyselekcjonowano deoksyrybozomy zależne od jonów wapnia  $Ca^{+2}$ , katalizujące

**Tabela 4**

Przykłady potencjalnych możliwości katalitycznych cząsteczek DNA.

Typ reakcji	Kofaktor	Enzymy białkowe wykazujące analogiczne właściwości katalityczne	Piśmiennictwo
Hydroliza wiązania fosfodiesterowego w RNA	$Mg^{2+}$	Rybonukleaza	[17, 21]
Hydroliza wiązania fosfodiesterowego w RNA	$Pb^{2+}$	Rybonukleaza	[16]
Hydroliza wiązania fosfodiesterowego w RNA	L-histydyna	Rybonukleaza	[31]
Hydroliza wiązania fosfodiesterowego w RNA	$Zn^{2+}$	Rybonukleaza	[28]
Hydroliza wiązania fosfodiesterowego w chimerach DNA/RNA	$Mg^{2+}/Ca^{2+}$	Nukleaza	[60]
Hydroliza wiązania fosfodiesterowego w jednonicowym DNA	$Mg^{2+}$	Nukleaza (enzym restrykcyjny dla jednonicowego DNA)	[62]
Zawiazywanie wiązania fosfodiesterowego w DNA/DNA	$Zn^{2+}/Cu^{2+}$	Ligaza	[63]
Hydroliza wiązania P-N w amidofosforanach DNA	$Mg^{2+}$	Fosforamidaza	[64]
Metalacja porfiryn	$Cu^{2+}$	Ferrochelataza	[15]
Fosforylacja 5'-terminalnej grupy OH w DNA z udziałem ATP	$Mg^{2+}$	Kinaza nukleotydowa	[42]
Zawiazywanie wiązania pirofosforanowego 5'-5' pomiędzy DNA i AMP	$Mg^{2+}$	Ligaza	[43]

hydrolizę wiązania fosfodiesterowego w chimerycznych oligonukleotydach [60]. Zależny od jonu wapnia enzym DNA przyspieszał reakcję cięcia wiązania internukleotydowego w chimerycznym DNA-RNA

około 1000 razy, podobnie jak rybozomy typu *hammerhead* [61].

Breaker i wsp. odkryli sekwencję DNA, posiadającą w obecności jonów miedzi właściwości cięcia własnego szkieletu fosforanowego, lub szkieletu DNA nici komplementarnej, [62]. Ten 69 nukleotydowy DNA przeprojektowano do krótszego jednonicowego DNA, zawierającego jedynie 46 nukleotydów. Skrócony enzym wykazywał aktywność identyczną z enzymem wyjściowym. Wykazano, że dla osiągnięcia aktywnej konformacji enzym DNA tworzy z substratem strukturę dupletu i trypletu (Ryc. 7a). Cztenonukleotydowy duplet jednego z ramion enzymu tworzy trójniciową strukturę z polipirymidynową nicią substratu według reguł parowania Hoogsteena. Zastosowana tutaj strategia hybrydyzacji do form trypleksowych pozwoliła na użycie tego deoksyrybozomu do degradacji specyficznego wiązania fosfodiesterowego w długim substracie

DNA. Taki deoksyrybozym spełnia niejako funkcję „enzymu restrykcyjnego” dla jednonicowego DNA.

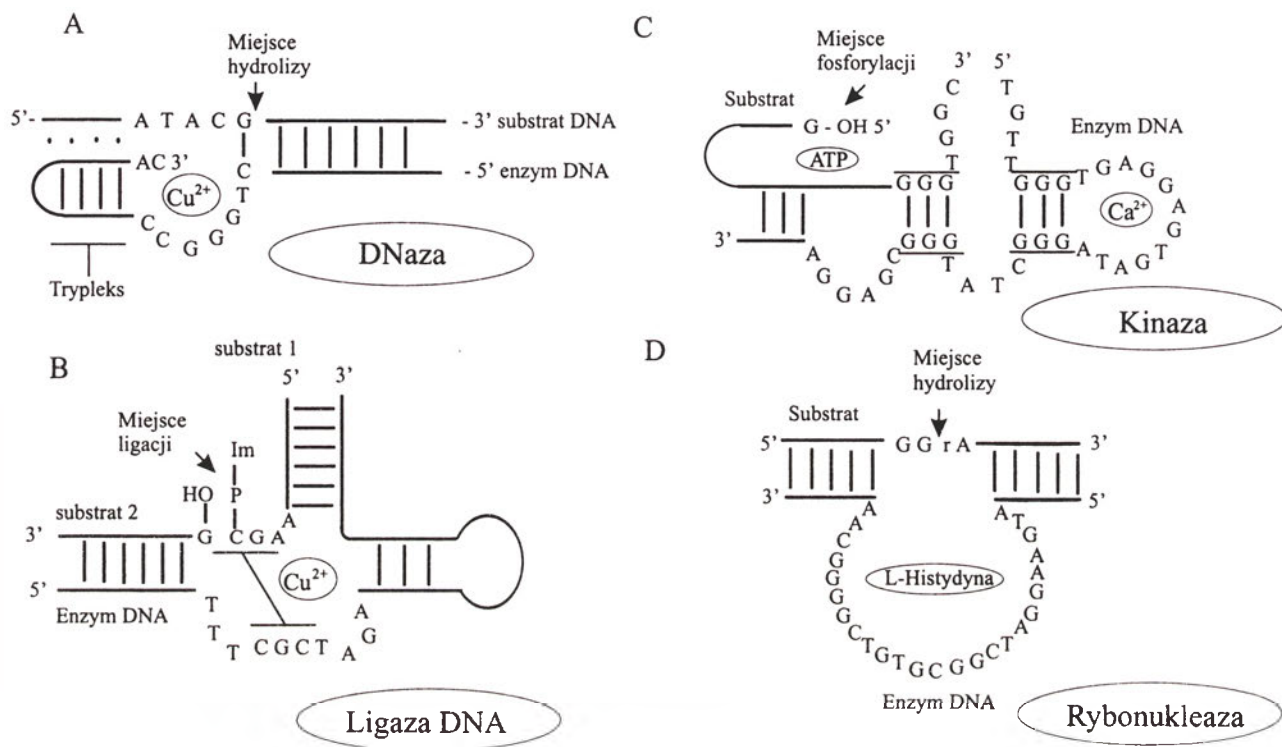
Spektrum aktywności katalitycznych DNA poszerzono także o zdolności ligacji dwóch fragmentów



DNA [63]. Wyselekcjonowano 47-nukleotydową sekwencję DNA zdolną, w obecności jonów  $Zn^{2+}$  lub  $Cu^{2+}$ , do zawiązywania wiązania fosfodiesterowego pomiędzy oligonukleotydem z 3'-terminalną grupą fosfoimidazolidową i 5'-terminalną grupą hydroksylową innego DNA, ze stałą katalizy  $k_{kat}$  0.07 min<sup>-1</sup> (Ryc. 7b).

dazy po związaniu z kompleksem protoporfiryny IX z  $Fe^{3+}$  [67].

Motyw tetrazy guaninowej zidentyfikowano także w deoksyrybozymach zdolnych do przyspieszania blisko milion razy reakcję samofosforylacji, poprzez przeniesienie reszty fosforanowej z ATP na 5'-terminalną grupę hydroksylową (Ryc. 7c) [42].



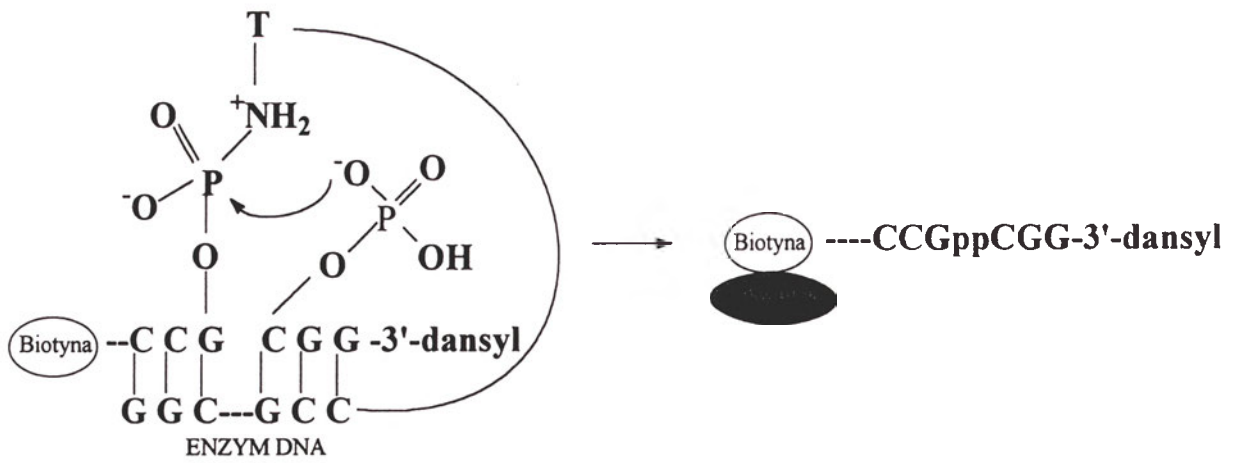
Ryc. 7. Motywy katalityczne cząsteczek DNA: A) katalizujących degradację wiązania fosfodiesterowego w DNA w obecności jonów  $Cu^{2+}$  [62]; B) spełniających funkcję ligazy DNA, zależnych od jonów  $Cu^{2+}$  lub  $Zn^{2+}$  [63]; C) DNAzymów spełniających funkcję kinazy DNA, zależnych od jonu  $Ca^{2+}$  [42]; D) nukleaz RNA, zależnych od L-histydyny [31].

Burmeister i wsp. wyselekcjonowali deoksyrybozym katalizujący hydrolizę wiązania amidofosforanowego w reakcji transfosforylacji z 5'-terminalną grupą fosforanową krótkiego oligonukleotydu zawierającego grupę dansylową [64]. Aktywność enzymu zależna była od stężenia jonów  $Mg^{+2}$  (Schemat 2).

Deoksyrybozomy katalizujące insercję jonu miedzi lub cynku do porfiryń wyselekcjonowano przez ich preferencyjne wiązanie się do analogów stanu przejściowego tego procesu [15]. Ten typ selekcji został wcześniej użyty dla selekcji rybozomu przyspieszającego reakcję izomeryzacji pochodnej bifenyli [65] oraz rybozomu katalizującego metalację porfiryń [14]. Jak wykazano w dalszych badaniach, jon miedzi nie jest wiązany przez cząsteczkę DNA. Ten niezwykle katalizator bogaty w pary G-C zawiera jedynie 24 nukleotydy, które tworzą strukturę tetrazy G w obecności jonów  $K^{+}$  [66]. Co ciekawsze, dwa spośród kilku deoksyrybozymów katalizujących metalację porfiryń wykazywały właściwości peroksy-

Odkrycie tego typu enzymów DNA stanowi mocny argument potwierdzający hipotezę, że DNA posiada dostatecznie szeroki repertuar właściwości katalitycznych, aby spełniać rolę enzymu w układach biologicznych. W tym samym laboratorium zidentyfikowano cząsteczki DNA katalizujące tworzenie wiązania 5'-5'-pirofosforanowego (typu „czapeczki”, ang. *cap*) pomiędzy 5'-terminalną grupą fosforanową DNA i AMP (Schemat 3) [43]. Tego typu produkty tworzą się w procesie ligacji DNA katalizowanym ligazą T4 DNA. Fakt istnienia takiego deoksyrybozomu sugeruje, że zależny od ATP *self-charging* DNA mógłby odpowiadać za proces klonowania DNA bez udziału enzymów białkowych.

Enzymy białkowe w swoim centrum aktywnym często posiadają pojedyncze aminokwasy, spełniające rolę katalizatorów. L-Histydyna jest katalitycznym aminokwasem w centrum aktywnym RNazy A. Czy zatem istnieją enzymy DNA, zależne od L-His, degradujące wiązanie fosfodiesterowe w RNA? Taki enzym DNA wyselekcjonowano w pro-

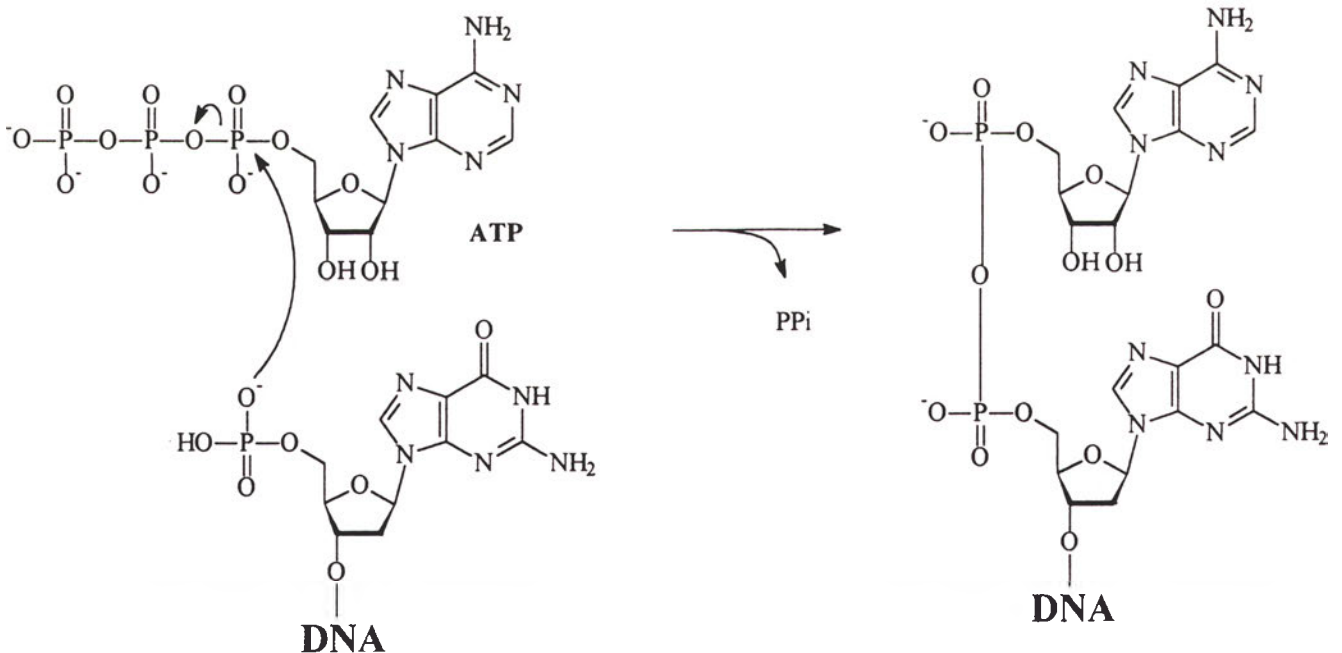


Schemat 2. Rozerwanie wiązania amidofosforanowego za pomocą enzymu DNA, zależnego od jonów  $Mg^{+2}$  [64].

cesie wielokrotnej selekcji i mutagenyzy wyjściowej biblioteki chimerycznych DNA (Ryc. 7d) [31]. Enzym ten przyspieszał reakcję hydrolizy wiązania P-O około milion razy w porównaniu do reakcji niekatalizowanej. Badania różnych pochodnych histydyny,

## VIII. Podsumowanie, perspektywy

Przykłady przedstawione w niniejszym przeglądzie pokazują, że metoda przyspieszonej ewolucji kwasów nukleinowych *in vitro*, poza do-



Schemat 3. Kataliza tworzenia wiązania pirofosforanowego 5'-5' za pomocą deoksyrybozemu [43].

oraz związków zawierających pierścień imidazolowy wykazały, że jedynie L-His oraz jej ester metylowy są aktywnymi kofaktorami deoksyrybozemu. Te wyniki sugerują, że katalizator specyficznie rozpoznaje L-histydynę i wiąże ją z maksymalnym powinowactwem, poprzez wszystkie dostępne grupy — atomy tlenu grupy karboksylowej, grupę  $NH_2$  oraz łańcuch boczny (pierścień imidazolu).

brze udokumentowanymi zaletami selekcji aptamerów i nowych rybozymów, jest także użyteczna do identyfikacji katalitycznych cząsteczek DNA. Odkrycie deoksyrybozymów ma szczególne znaczenie w aspekcie łatwej dostępności syntetycznych oligonukleotydów DNA i ich wysokiej trwałości chemicznej i enzymatycznej w porównaniu z innymi biopolimerami. Te cechy zwiększają atrakcyjność katali-

tycznych DNA jako potencjalnych terapeutyków oraz katalizatorów użytecznych w procesach chemicznych i biologicznych, a także szerzej pojętych procesach technologicznych [37]. Technologia deoksyrybozymów może stanowić nowe podejście do terapii genowej. Zaletą, w porównaniu z terapią antysensową i terapią rybozymami jest fakt, że deoksyrybozymy wykazują wyższą aktywność endogenną oraz są bardziej odporne na degradację endonukleazami. Enzymy DNA oferują także możliwość ich wykorzystania w warunkach odbiegających od warunków fizjologicznych.

## Podziękowania

Niniejsza praca była finansowana z funduszu grantu KBN nr 3T09A 039 17.

Artykuł otrzymano 23 kwietnia 2001  
Zaakceptowano do druku 10 stycznia 2002

## Piśmiennictwo

- Kruger K, Grabowski PJ, Zaugg AJ, Sands J, Gottschling DE, Cech TR (1982) *Cell* **31**: 147-157
- Guerrier-Takada C, Gardiner K, Marsh T, Pace N, Altman S (1983) *Cell* **35**: 849-857
- Tuerk C, Gold L (1990) *Science* **249**: 505-510
- Bartel DP, Szostak JW (1993) *Science* **261**: 1411-1418
- Eklund EH, Bartel DP (1996) *Nature* **382**: 373-376
- Robertson DL, Joyce GF (1990) *Nature* **344**: 467-468
- Lorsch JR, Szostak JW (1994) *Nature* **371**: 31-36
- Illangasekare M, Sanchez G, Nickles T, Yarus M (1995) *Science* **267**: 643-647
- Lohse PA, Szostak JW (1996) *Nature* **381**: 442-444
- Zhang B, Cech TR (1998) *Chem Biol* **10**: 539-553
- Zhang B, Cech TR (1997) *Nature* **390**: 96-100
- Tarasow TM, Tarasow SL, Eaton BE (1997) *Nature* **389**: 54-57
- Seelig B, Jaschke A (1999) *Chem Biol* **6**: 167-176
- Conn MM, Prudent JR, Schultz PG (1996) *J Am Chem Soc* **118**: 7012-7013
- Li Y, Sen D (1996) *Nat Struct Biol* **3**: 743-747
- Breaker RR, Joyce GF (1994) *Chem Biol* **1**: 223-229
- Breaker RR, Joyce GF (1995) *Chem Biol* **2**: 655-660
- Carmi N, Shultz LA, Breaker RR (1996) *Chem Biol* **3**: 1039-1046
- Krakowiak A, Koziołkiewicz M (1998) *Post Bioch* **44**: 306-317
- Nawrot B (2000) *Wiad Chem* **54**: 616-636
- Santoro SW, Joyce GF (1997) *Proc Natl Acad Sci USA* **94**: 4262-4266
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Mullis KB, Erlich HA (1988) *Science* **239**: 487-491
- Horn S, Schwenzer B (1999) *Antisense Nucleic Acids Drug Dev* **9**: 465-472
- Ota N, Warashina M, Hirano K, Hatanaka K, Taira K (1998) *Nucleic Acids Res* **26**: 3385-3391
- Santoro SW, Joyce GF (1998) *Biochemistry* **37**: 13330-13342
- Sun LQ, Cairns MJ, Saravolac EG, Baker A, Gerlach WL (2000) *Pharmacol Rev* **52**: 325-347
- delCardayre SB, Raines RT (1994) *Biochemistry* **33**: 6031-6037
- Li J, Zheng W, Kwon AH, Lu Y (2000) *Nucleic Acids Res* **28**: 481-488
- Cairns MJ, Hopkins TM, Witherington C, Sun LQ (2000) *Antisense Nucleic Acids Drug Dev* **10**: 323-332
- Westhof E (1999) *Science* **286**: 61-62
- Roth A, Breaker RR (1998) *Biochemistry* **95**: 6027-6031
- Geyer M, Sen D (1997) *Chem Biol* **4**: 579-593
- Nakano S, Chadalavada DM, Bevilacqua PC (2000) *Science* **287**: 1493-1497
- Nissen P, Hansen J, Ban N, Moore PB, Steitz TA (2000) *Science* **289**: 920-930
- Scott WG, Klug A (1996) *Trends Biochem Sci* **21**: 220-224
- Nowakowski J, Shim PJ, Prasad GS, Stout CD, Joyce GF (1999) *Nat Struct Biol* **6**: 151-156
- Warashina M, Kuwabara T, Nakamatsu Y, Taira K (1999) *Chem Biol* **6**: 237-249
- Wu Y, Yu L, McMahon R, Rossi JJ, Forman SJ, Snyder DS (1999) *Hum Gene Ther* **10**: 2847-2857
- Gewirtz AM, Sokol DL, Ratajczak MZ (1998) *Blood* **92**: 712-736
- Zhang X, Xu Y, Ling H, Hattori T (1999) *FEBS Lett* **458**: 151-156
- Dash BC, Harikrishnan TA, Goila R, Shahi S, Unwalla H, Husain S, Banerjee AC (1998) *FEBS Lett* **431**: 395-399
- Li Y, Breaker RR (1999) *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 2746-2751
- Li Y, Liu Y, Breaker RR (2000) *Biochemistry* **39**: 3106-3114
- Nawrot B, Tanabe T, Taira K, Stec WJ (2001) *praca nieopublikowana*
- Goila R, Banerjee AC (1998) *FEBS Lett* **436**: 233-238
- Basu S, Sriram B, Goila R, Banerjee AC (2000) *Antiviral Res* **46**: 125-134
- Sioud M, Sorensen R (1998) *Nature Biotech* **16**: 556-561
- Capiati DA, Vazquez G, Tellez Inon MT, Bolland RL (2000) *Cell Prolif* **33**: 307-315
- Yuen AR, Halsey J, Fisher GA, Holmlund JT, Geary RS, Kwoh TJ, Dorr A, Sikic BI (1999) *Clin Cancer Res* **5**: 3357-3363
- McKay RA, Miraglia LJ, Cummins LL, Owens SR, Sasmor H, Dean NM (1999) *J Biol Chem* **274**: 1715-1722
- Leirdal M, Sioud M (1999) *Br J Cancer* **80**: 1558-1564
- Sioud M, Leirdal M (2000) *J Mol Biol* **296**: 937-947
- Sun LQ, Cairns MJ, Gerlach WL, Witherington C, Wang L, King A (1999) *J Biol Chem* **274**: 17236-17241
- Shi Y, Hutchinson HG, Hall DJ, Zalewski A (1993) *Circulation* **88**: 1190-1195
- Santiago FS, Lowe HC, Kavurma MM, Chesterman CN, Baker A, Atkins A, Khachigian LM (1999) *Nat Med* **5**: 1264-1269
- Asahina Y, Ito Y, Wu CH, Wu GY (1998) *Hepatology* **28**: 547-554
- Yen L, Strittmatter SM, Kalb RG (1999) *Ann Neurol* **46**: 366-373
- Cairns MJ, Hopkins TM, Witherington C, Wang L, Sun LQ (1999) *Nature Biotech* **17**: 480-486
- Cairns MJ, King A, Sun LQ (2000) *Nucleic Acids Res* **28**: e9
- Faulhammer D, Famulok M (1997) *J Mol Biol* **269**: 188-202
- Yang J-H, Perreault J-P, Labuda D, Usman N, Cedergren R (1990) *Biochemistry* **29**: 11156-11160
- Carmi N, Shameelah RB, Breaker RR (1998) *Biochemistry* **95**: 2233-2237
- Cuenoud B, Szostak JW (1995) *Nature* **375**: 611-614
- Burmeister J, Kiedrowski G, Ellington AD (1997) *Angew Chem Int Ed Engl* **36**: 1321-1324
- Prudent JR, Uno T, Schultz PG (1994) *Science* **264**: 1924-1927
- Li Y, Sen D (1997) *Biochemistry* **36**: 5589-5599
- Travascio P, Li Y, Sen D (1998) *Chem Biol* **5**: 505-517

# Proteoliza białek regulujących przebieg cyklu komórkowego — udział ubikwitynacji

## Proteolysis of protein cell cycle regulators — involvement of ubiquitination

BARBARA GRZELAKOWSKA-SZTABERT

### Spis treści:

- I. Nobel dla badaczy cyklu komórkowego
- II. Proteoliza białek regulatorowych cyklu komórkowego - ubikwitynacja białek i ich degradacja w proteasomie
- III. Ligaza ubikwitynowa SCF
  - III-1. Budowa i regulacja działania
  - III-2. Substraty ligazy SCF
    - III-2.1. Cyklina E i inhibitory kinaz cdk z rodziny CIP/KIP
    - III-2.2. Cyklina D i inhibitory kinaz cdk z rodziny INK
    - III-2.3. Czynniki transkrypcyjny E2F-1
- IV. Ligaza ubikwitynowa APC/C
  - IV-1. Budowa i regulacja działania
  - IV-2. Substraty ligazy APC/C
    - IV-2.1. Białko Pds1/Cut2
    - IV-2.2. Cykliny mitotyczne
    - IV-2.3. Geminina
- V. Ligaza VBC-CUL2
- VI. Uwagi końcowe

### Contents:

- I. Nobel for cell cycle researchers
- II. Proteolysis of protein cell cycle regulators – ubiquitination of proteins and their degradation in proteasome
- III. Ubiquitin ligase SCF
  - III-1. Structure and functioning
  - III-2. Substrates of ligase SCF
    - III-2.1. Cyclin E and inhibitors of cdk kinases from CIP/KIP family
    - III-2.2. Cyclin D and inhibitors of cdk kinases from INK family
    - III-2.3. Transcription factor E2F-1
- IV. Ubiquitin ligase APC/C
  - IV-1. Structure and functioning
  - IV-2. Substrates of ligase APC/C
    - IV-2.1. Protein Pds1/Cut2
    - IV-2.2. Mitotic cyclins
    - IV-2.3. Geminin
- V. Ligase VBC-CUL2
- VI. Concluding remarks

**Wykaz stosowanych skrótów:** APC/C, ligaza ubikwitynowa — kompleks promujący rozpoczęcie w komórkach anafazy /cyklosom; CIP/KIP i INK — rodziny inhibitorów kinaz cdk; Cln i Clb — cykliny działające w fazach G1 i S w komórkach drożdży; Cull1 — kullina w komórkach ludzkich; Cut2 (ang. *cut untimely torn*) — inhibitor anafazy w *S. pombe*; Fbp — białka z motywem „F-box”; kinazy cdk — kinazy cyklinozależne; p27, p57, p21, p19 — białkowe inhibitory kinaz cdk; PCNA — antygen jądrowy proliferujących komórek; Pds1 (ang. *precocious dissociation of sister chromatids*) inhibitor anafazy w *S. cerevisiae*; SCF — ligaza ubikwitynowa; Sic1 — inhibitor kinaz cdk w komórkach drożdży; Ub — ubikwityna; VBC-CUL-2 — ligaza ubikwitynowa.

### I. Nobel dla badaczy cyklu komórkowego

Laureatami tegorocznej nagrody Nobla z dziedziny fizjologii i medycyny zostali — Amerykanin Leland Hartwell, dyrektor Fred Hutchinson Cancer Center w Seattle, Brytyjczycy — Paul Nurse, kierownik Laboratorium Cyklu Komórkowego i dyrektor Imperial Cancer Research Found (ICRF) w Londynie, oraz Timothy Hunt, kierownik Laboratorium Kontroli Cyklu Komórkowego, także w ICRF. Nagrodą tą, jak to uzasadnia Komitet Noblowski, zostały uhonorowane ich odkrycia „głównych regulatorów cyklu komórkowego”, ponieważ pozwalają na zrozumienie molekularnych mechanizmów kierujących podziałami komórkowymi.

Prof. dr hab.; Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego, PAN, 02-093 Warszawa, ul. Pasteura 3, tel: 659 30 72, e-mail: bgs@nencki.gov.pl

**Leland Hartwell** (ur. 1939) jest pionierem badań cyklu komórkowego. Udowodnił on we wczesnych latach 70-tych, że cykl podziałowy prostej komórki eukariotycznej drożdży pozostaje pod ścisłą kontrolą wielu genów. Do tego wniosku doprowadziła go analiza otrzymanych w laboratorium mutantów *Saccharomyces cerevisiae* (mutanty *cdc* — ang. *cell-division-cycle*), charakteryzujących się określonymi zaburzeniami w przebiegu cyklu. W efekcie zidentyfikował ponad 100 genów, które kontrolują w komórkach *S. cerevisiae* cykl komórkowy. Dziś wiadomo już, że w komórkach wyższych organizmów eukariotycznych działają geny homologiczne z genami wykrytymi w drożdżach badanych przez Hartwell'a. Jemu też zawdzięczamy wprowadzenie i uzasadnienie poglądu o współzależności wydarzeń kontrolowanych przez geny *cdc* podczas cyklu komórkowego. Klasyczne stało się już określenie: punkt START w fazie G1. Oznacza ono moment, w którym następuje integracja zewnątrz- i wewnątrzkomórkowych sygnałów, umożliwiających skoordynowane rozpoczęcie w komórkach syntezy DNA, a także dalszych faz cyklu. Procesy zachodzące w **punkcie START** kontroluje, wykryta przez Hartwell'a, kinaza serynowo-treoninowa, kodowana w *S. cerevisiae* przez gen *CDC28*, prototyp wykrytych następnie w innych organizmach kinaz tego typu. Inne wprowadzone w 1989 roku przez Hartwell'a określenie, to **punkty kontrolne cyklu**, to znaczy momenty, w których następuje jego zatrzymanie, gdy białka regulatorowe wykryją jakiegokolwiek nieprawidłowości w procesach komórkowych, (takie jak np. uszkodzenia DNA w komórce po podawaniu leków czy depolimeryzacja mikrotubul). Wznowienie cyklu w komórce może nastąpić dopiero po naprawieniu takich uszkodzeń. Pogląd Hartwell'a wskazujący, że początek jednego wydarzenia może nastąpić tylko po prawidłowym zakończeniu wydarzenia poprzedniego, okazał się bardzo owocny w dalszych badaniach, ułatwił bowiem zrozumienie w jaki sposób utrzymywana jest w komórkach integralność genomu i niepowielanie zaistniałych błędów.

Opisano już wiele genów kodujących białka działające w określonych punktach kontrolnych. Klasyczny przykład stanowią białka p53 i ATM, których mutacje w wielu komórkach nowotworowych wywołują niestabilność genomu i przyczyniają się

do rozwoju nowotworów. Prowadzone przez Hartwell'a badania dotyczą w ostatnich latach mechanizmów molekularnych, dzięki którym komórki nowotworowe uniezależniają się od punktów kontrolnych cyklu oraz nowych leków przeciwnowotworowych, prowadzone przy użyciu drożdży, jako organizmu testowego.

**Paul Nurse** (ur. 1949) jest badaczem, któremu zawdzięcza się wykrycie w komórkach *Schizosaccharomyces pombe* genu *cdc2*, a w innych komórkach eukariotycznych także genów homologicznych z wykrytym przez Hartwell'a genem *CDC28*. Jak dotąd zidentyfikowano co najmniej 6 genów kodujących te serynowo-treoninowe kinazy, nazywane kinazami cdk (ang. *cyclin dependent kinases*). Działają one w różnych fazach cyklu, a ich substratami są białka czynne w różnych procesach komórkowych, zwłaszcza regulacyjnych. O aktywności kinaz cdk decyduje, jak wykazały między innymi badania Nurse'a, ufosforylowanie w nich określonych reszt aminokwasowych. Badania lat ostatnich prowadzone w laboratorium Nurse'a dotyczą molekularnych mechanizmów odpowiedzialnych za inicjację replikacji DNA oraz kontroli podziału mejotycznego i morfogenezy komórek.

**Tim Hunt** (ur. 1943) znany jest jako odkrywca w komórkach morskich jeżowców **cyklin**, białek syntetyzowanych i degradowanych w każdym cyklu komórkowym. Podstawową funkcją cyklin w komórce jest regulowanie aktywności kinaz cdk, a także, jak wykazano ostatnio, działania niektórych białek nieenzymatycznych, takich jak np. receptory steroidów. Obecne badania Hunt'a dotyczą fizjologicznej roli poszczególnych cyklin i aktywowanych przez nie kinaz w określonych fazach cyklu. Dużo uwagi poświęca on także badaniom mechanizmów odpowiedzialnych za rozpoznawanie przez kompleksy kinazowo-cyklinowe białek mających ulec fosforylacji, a także proteolitycznej degradacji cyklin w proteasomie.

W ostatnich dziesięciu latach problemom cyklu komórkowego i różnym aspektom jego regulacji poświęcono w *Postęпах Biochemii* wiele artykułów\*, dlatego nie będę ich omawiać w obecnym opracowaniu, ukierunkowanym na przedstawienie informacji o degradacji białek bezpośrednio uczestniczących w regulacji cyklu.

\*Jakubowicz T (1991) *Post Biochem* 37: 9-18; Grzelakowska-Sztabert B (1992) *Post Biochem* 38: 98-107; Grzelakowska-Sztabert B (1995) *Post Biochem* 41: 81-93; Wiślak T (1997) *Post Biochem* 43: 85-90

## II. Proteoliza białek regulatorowych cyklu komórkowego — ubikwitynacja białek i ich degradacja w proteasomie

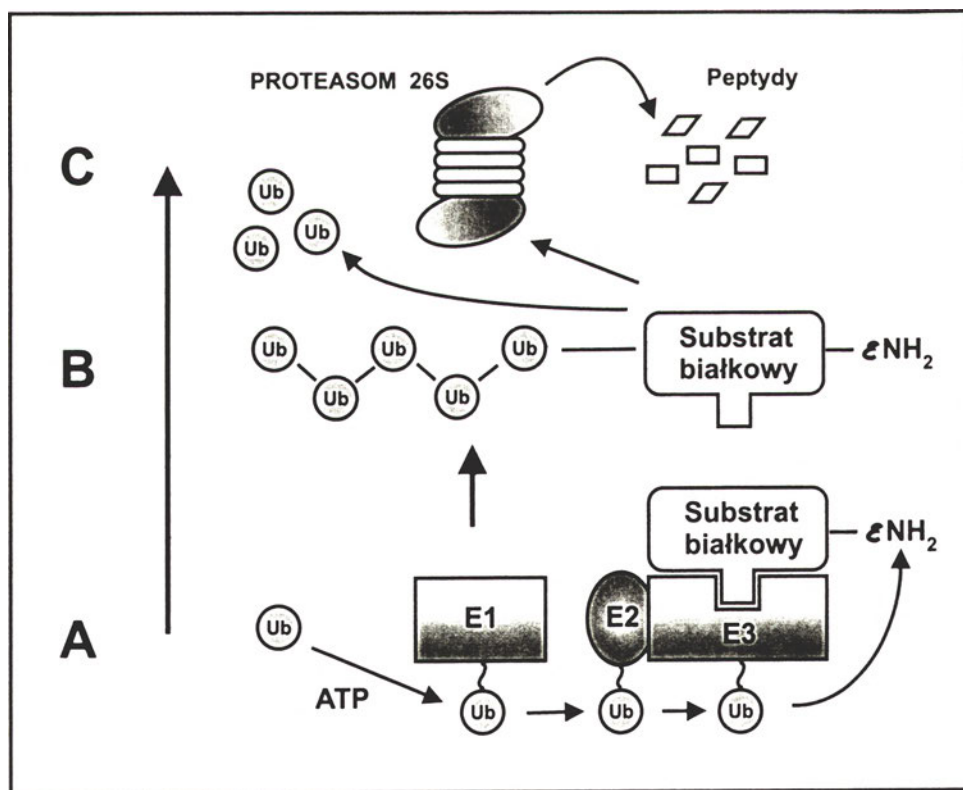
W komórkach eukariotycznych wiele białek nieprawidłowych, a także białek regulatorowych o krótkim okresie półtrwania ulega degradacji w proteasomie 26S — dużym, wieloskładnikowym kompleksie białkowym, charakteryzującym się szerokim spektrum aktywności proteolitycznej. Degradowane w proteasomie białka i peptydy są uprzednio wyznakowywane ubikwityną, małym (76 AA), powszechnie występującym białkiem globularnym. W kaskadowym, zachodzącym przy udziale ATP, procesie ubikwitynacji białek uczestniczą co najmniej trzy enzymy: enzym aktywujący ubikwitynę (E1), enzym łączący się z zaktywowaną ubikwityną (E2) i przenoszący ją na białkowy substrat bądź bezpośrednio, bądź też częściej w wyniku współdziałania z ligazą ubikwitynową (E3) (Ryc. 1). Obecnie wiadomo, że ligazy ubikwitynowe stanowią kompleksy kilku (kilkunastu?) białek uczestniczących w precyzyjnym

dołączenie ubikwityny wydaje się być niezbędne do endocytozy niektórych białek błonowych i tym samym może wpływać na integralność błon [2, 3].

Badania mechanizmu ubikwitynacji białek oraz struktury i funkcjonowania proteasomu datują się od wczesnych lat 80-tych i są nadal intensywnie rozwijane ze względu na biologiczne znaczenie precyzyjnej kontroli procesu degradacji białek. Bardzo liczne artykuły przeglądowe omawiają ten problem [4-9], także czasopisma polskie [10, 11].

Także degradacja białek uczestniczących w kontroli przebiegu kolejnych faz cyklu komórkowego następuje w proteasomie. W szczególności dotyczy to cyklin, inhibitorów kinaz białkowych cdk, białek odpowiedzialnych za rozpoczęcie syntezy DNA czy też za precyzyjną segregację chromatyd podczas mitozy itp. Rezultatem takiej nieodwracalnej degradacji białek regulatorowych cyklu jest „jednokierunkowość” jego przebiegu.

Ostatni etap ubikwitynacji białek uczestniczących w regulacji cyklu komórkowego przeprowadzają dwa wieloskładnikowe kompleksy ligaz ubikwityno-



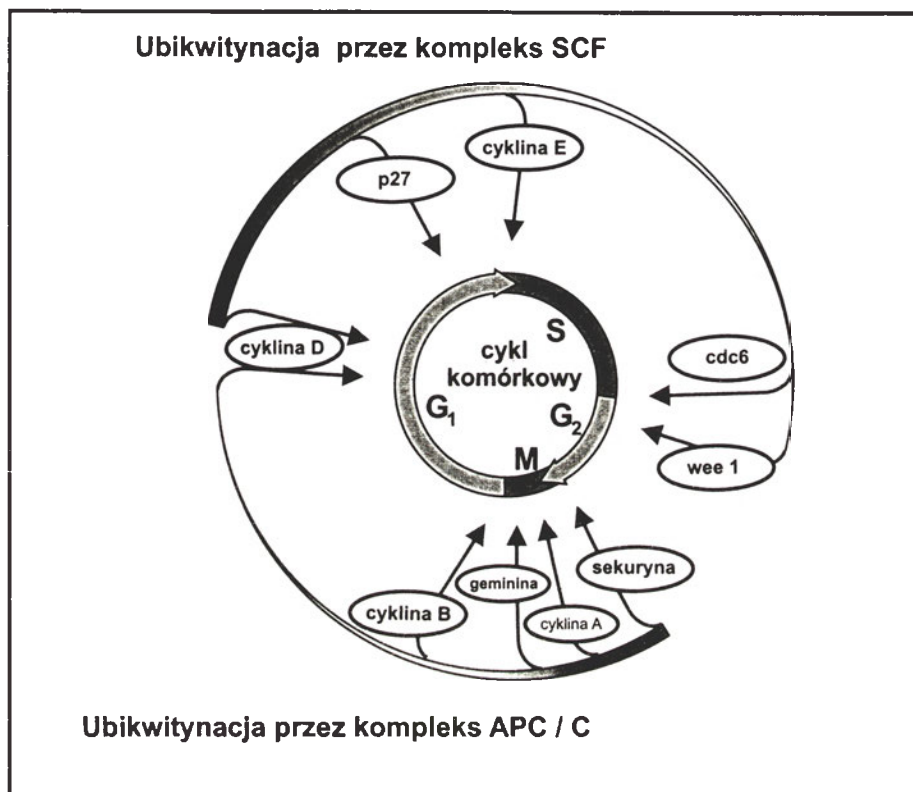
Ryc. 1. Schemat ubikwitynacji białek przed ich degradacją w proteasomie 26S i udział w tych procesach enzymów – E1 (aktywującego Ub), E2 (koniugującego) i E3 (ligazy ubikwitynowej). Przed wejściem do proteasomu ubikwityna zostaje odłączona, a białka ulegają w nim rozkładowi do krótkich peptydów.

rozpoznawaniu i wiązaniu białkowych substratów i ich translokacji do proteasomu, w którym ulegają degradacji do krótkich peptydów. Modyfikacja białka ubikwityną nie zawsze jednak musi prowadzić do degradacji do prostych peptydów [1]. Tak na przykład

wych — SCF i APC/C [12-15], działające w różnych fazach cyklu komórkowego. Kompleks ligazy SCF działa od połowy fazy G1, poprzez fazę S do połowy fazy G2 i ubikwitynuje cykliny i inhibitory kinaz cdk, a kompleks ligazy APC/C aktywny od połowy

fazy G<sub>2</sub>, w mitozie i na początku fazy G<sub>1</sub>, dołącza ubikwitynę przede wszystkim do cyklin mitotycznych A i B oraz tzw. sekuryń, białek będących inhibitorami mitozy (Ryc. 2). Należy zdawać sobie sprawę, że w komórkach występują i inne kompleksy ligaz ubikwitynowych, jednakże ich bezpośredni udział w regulacji cyklu komórkowego nie został wykazany.

pleksu, jego działanie i tym samym stabilność białka Sic1 i cyklin Cln ma wpływ ich ufosforylowanie, przeprowadzane przez jedną z kinaz cyklinozależnych (np. CDC28, [19]). Zaproponowano więc, aby omawiany kompleks nazwać PULC (ang. *Phospho-protein — Ubiquitin — Ligase — Complex*), podkreślając tym samym znaczenie faktu, że tylko ufosfory-



Ryc. 2. Cykl komórkowy. Zaznaczony udział ligaz SCF i APC/C w degradacji białek regulatorowych cyklu (z danych 43 i 145).

Omówienie budowy i działania kompleksów ligazowych SCF i APC/C i znaczenia degradacji ubikwitynowanych przez nie białek dla przebiegu cyklu komórkowego stanowi treść tego opracowania.

### III. Ligaza ubikwitynowa SCF

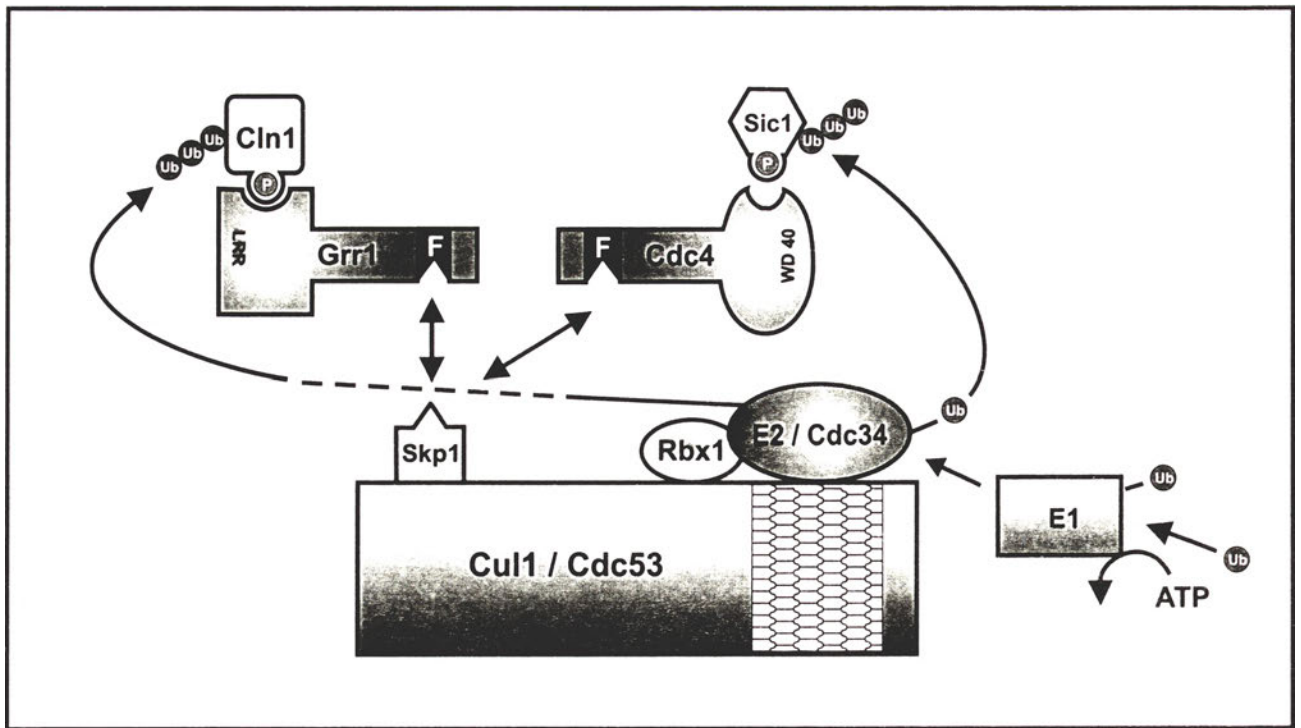
#### III-1. Budowa i regulacja działania

Białko kodowane w komórkach pączkujących drożdży *S. cerevisiae* przez gen *cdc53* jest podstawowym składnikiem ligazy ubikwitynowej SCF (E3). Wskazują na to dane uzyskane w badaniach mechanizmu degradacji białka Sic1, inhibitora cyklinozależnej kinazy CDC28 oraz cyklin Cln działających w fazie G<sub>1</sub> ich cyklu podziałowego [16-18] (Ryc. 3). Białko to, Cdc53, spełnia kryteria ligazy — tworzy trójskładnikowe kompleksy z substratami, które mają podlegać proteolizie oraz z białkiem E2 przenoszącym zaktywowaną ubikwitynę i kodowanym w *S. cerevisiae* przez gen *cdc34*. Dalsze badania wykazały, że na tworzenie tego trójskładnikowego kom-

lowane białka są substratami tej ligazy [20]. Nazwa ta jednak nie przyjęła się.

W kolejnych latach zidentyfikowano homologi białka Cdc53 wykrytego w *S. cerevisiae* w komórkach innych organizmów (*Cullin* w *Caenorhabditis elegans*, [21]; Cul 1 w komórkach ludzkich [22]). Wykazano także, że istotnymi składnikami kompleksu ligazy SCF są białka zawierające tzw. motyw F (ang. *F-box*), zwane dalej białkami Fbp (ang. *F-box proteins*), odpowiedzialne za rozpoznawanie i wychwytywanie białek mających ulec ubikwitynacji [23-25] oraz białko Skp 1, którego rolą wydaje się być ułatwienie wiązania białek Fbp z pozostałymi podjednostkami kompleksu (Ryc. 3) [26-27].

Jako podstawowe jednostki omawianej ligazy uważa się zatem trzy białka — Skp1, kullinę (*Cullin/Cdc53*) i jedno z białek z motywem „*F-box*” (Fbp), które zostaną kolejno omówione. Ich kompleks przyjęto nazywać kompleksem SCF (od początkowych liter składników). Dodatkowym składnikiem kompleksu SCF jest także wykryte ostatnio białko Rbx1/Hit1/Roc1 [28-29].



Ryc. 3. Ubikwytynacja cykliny Cln1 i białka Sic1 w komórkach *S. cerevisiae* katalizowana przez ligazę SCF. W rozpoznaniu i wiązaniu ufosforylowanych Cln1 i Sic1 biorą udział dwa różne białka (Grr1 i Cdc4) z motywem „F-box”, zaznaczonym na rysunku jako F oraz domenami WD40 i LRR (z danych 18 i 28, zmodyf.). Dalsze objaśnienia w tekście.

**Kullina** (*Cullin1*)/Cdc53 jest białkiem tworzącym jakby pomost (ang. *scaffold*), na którym dochodzi do współdziałania z innymi podjednostkami kompleksu. Obecność N-końcowej domeny w cząsteczce kulliny jest niezbędna do wiązania podjednostki Skp1, natomiast C-koniec jej cząsteczki uczestniczy w wiązaniu enzymu E2 niosącego zaktywowaną ubikwitynę [30]. W interakcji E2 i kulliny może pośredniczyć białko Rbx1/Roc1 [28], któremu przypisuje się także wpływ na autopolubikwytynację samego enzymu E2.

Podjednostka **Skp1** jest małym białkiem występującym w kompleksach ligaz ubikwytynowych wszystkich komórek eukariotycznych [26]. Oddziałuje ono z białkami Fbp, takimi jak np. białka Cdc4 i Grr1 w komórkach drożdży (Ryc. 3) czy też Skp2 w komórkach ludzkich. Ostatnio przedstawiono strukturę krystaliczną kompleksu podjednostek Skp1 i Skp2 [31].

Integralnym składnikiem kompleksu ligazy SCF jest także jedno z **białek Fbp**, które charakteryzuje obecność około 40 aminokwasowej sekwencji nazwanej „F-box” i opisanej po raz pierwszy w cyklinie F [26]). Wspólną cechą białek Fbp jest fakt wiązania przez nie białek (na ogół uprzednio ufosforylowanych) mających ulec ubikwytynacji, różnią się zaś one obecnością specyficznych domen aminokwasowych odpowiedzialnych za interakcje białko-białko,

takich jak WD40 (ang. *WD40 repeats* [32]) czy też powtórzenia leucynowe LRR [33]. Charakterystykę domen strukturalnych w poznanych dotychczas białkach Fbp przedstawiono w pracy przeglądowej [25]. Obecność białek Fbp stwierdzono praktycznie we wszystkich badanych organizmach: 15 w komórkach *S. cerevisiae*, 215 w *C. elegans*, w komórkach ssaków występuje ich prawdopodobnie kilkaset [34]. Powszechność i liczebność występowania białek Fbp sugeruje, że kompleks SCF może ubikwytynować i skierowywać w komórce na drogę degradacji setki różnych białek.

Od wykrycia składników kompleksu ligazy SCF upłynęło niewiele lat, ale już pojawiają się doniesienia o regulacji ekspresji genów kodujących poszczególne białka tworzące jego podjednostki. I tak w 2000 r. doniesiono, że protoonkogen c-Myc, białko modulujące ekspresję wielu genów uczestniczących w regulacji cyklu komórkowego [35-37], może również promować zależną od ubikwityny proteolizę białek. W mysich fibroblastach c-Myc aktywuje bowiem ekspresję genu *cul 1*, kodującego kullinę, główną podjednostkę kompleksu ligazy SCF [38]. Natomiast białko supresorowe PTEN (fosfataza PIP<sub>3</sub>), hamuje rozpoczęcie fazy S w mysich komórkach embrionalnych, ponieważ wpływa na stabilność białka p27, inhibitora kinaz cdk. Nadekspresja białka PTEN, a więc w efekcie hamowanie aktywno-



ści kinazy PI (PI-3 kinazy) wywołuje spadek ekspresji genu kodującego białko Skp2 zawierające motyw *F-box*, które to rozpoznaje i wiąże inhibitor p27 [39]. Nie obserwowano zaś wpływu nadekspresji PTEN na geny kodujące inne podjednostki kompleksu SCF.

### III-2. Substraty ligazy SCF

Jak już wspomniano, w komórkach *S. cerevisiae* kompleks SCF ubikwytynuje przede wszystkim **cykliny Cln**, działające w fazie G1, oraz inhibitor kinaz cdk — **białko Sic1** [18, 40, 41]. Ryc. 3 przedstawia schematycznie kompleksy SCF uczestniczące w ubikwytynacji i degradacji ufosforylowanych białek Sic1 i Cln1. W rozpoznaniu i wiązaniu tych białek biorą udział dwa różne białka Fbp kodowane odpowiednio przez geny *cdc4* i *Grr1*. Substratami ligazy SCF w komórkach drożdży są także: białko Far1, inhibitor kinaz cdk, białko Cdc6/Cdc18 konieczne do rozpoczęcia syntezy DNA (ang. *DNA replication factor*) oraz kinaza Swe1/Wee1 inaktywująca kinazę cdk, której aktywność jest niezbędna dla przebiegu mitozy. Te białkowe substraty rozpoznają i wiążą takie białka Fbp jak Cdc4 i białko Met30 [13]. Ubikwytynowane i prawdopodobnie degradowane w proteasomie są także białka Cdc34 i Grr1.

W komórkach ludzkich ligaza SCF jest niezbędna dla degradacji cyklin D i E, inhibitorów kinaz cdk – białek p27 i prawdopodobnie także p57 i p21 (rodzina inhibitorów CIP/KIP) oraz czynnika transkrypcyjnego E2F-1. Najwięcej badań dotyczy ubikwytynacji i degradacji cykliny E będącej podjednostką regulatorową kinazy cdk2 oraz białka p27, dzięki czemu ich wzajemne relacje są dziś w znacznym stopniu poznane. Natomiast pozostaje do wyjaśnienia, czy sama kinaza cdk2 również ulega degradacji w proteasomie.

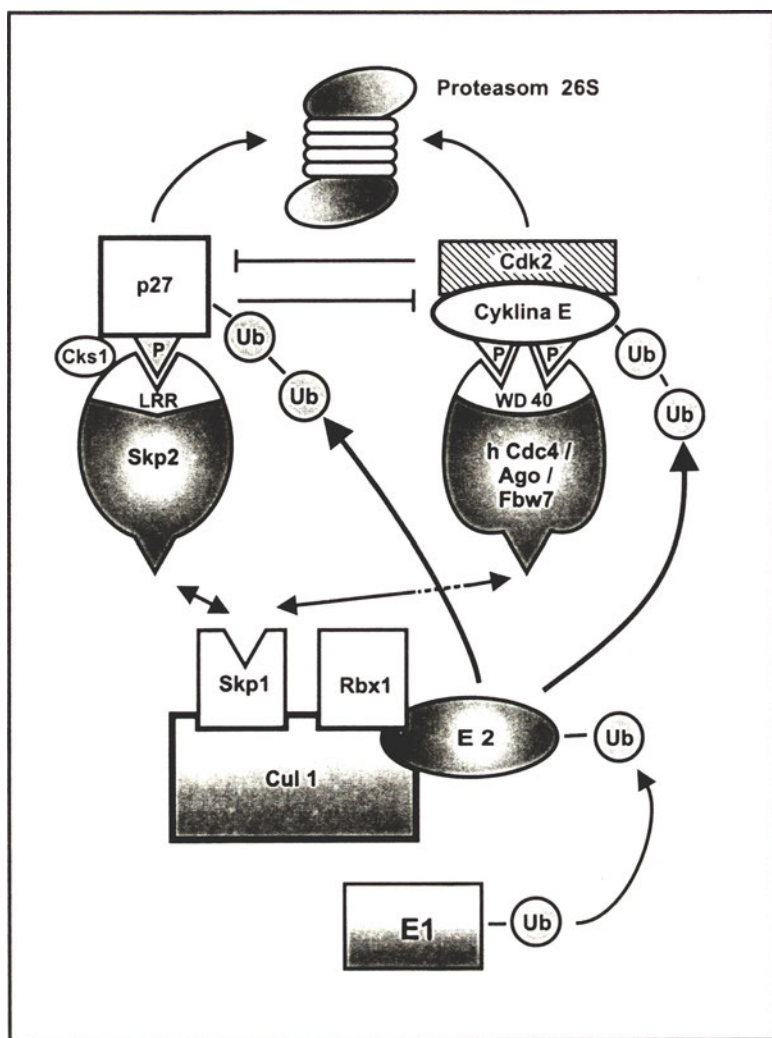
#### III-2.1. Cyklina E i inhibitory kinaz cdk z rodziny CIP/KIP

**Cyklina E** (pozytywny regulator cyklu) ulega silnej ekspresji na granicy faz G1 i S i promuje wówczas, dzięki zaktywowaniu kinazy cdk2, rozpoczęcie replikacji DNA. Zmiany wewnątrzkomórkowego poziomu cykliny E są nie tylko wynikiem periodycznych zmian intensywności transkrypcji kodującego genu, lecz również precyzyjnie kontrolowanej proteolizy. Zbyt niski poziom cykliny E zatrzymuje komórki w fazie G1, nadmiernie wysoki powoduje zaś przedwczesne wejście ich w fazę S, niestabilność genomu, a może też prowadzić do transformacji nowotworowej [42]. Udział ligazy SCF w ubikwytynacji i degradacji cykliny E związanej z kinazą cdk2 jak i

formie wolnej wydaje się niewątpliwy [34, 43, 44]. Ustalenie natomiast, które z białek Fbp rozpoznaje i wiąże cyklinę E i czy jej ufosforylowanie jest niezbędne w tym procesie jest ciągle przedmiotem intensywnych badań i wielu kontrowersji. Do niedawna uważano, że cyklinę E (a także p27) rozpoznaje białko Skp2 [34, 43, 45]. Opublikowane w październiku 2001 badania dokumentują jednak, że to nie Skp2, a inne białko Fbp, nazwane w komórkach ludzkich białkiem hcdc4 [46] bądź Fbw7 [47], a w komórkach *Drosophila melanogaster* białkiem Archipelago (Ago, [48]) jest odpowiedzialne za wychwytywanie i degradację cykliny E (Ryc. 4). Przynajmniej w odniesieniu do białka Ago wiadomo, że poziom jego ekspresji zmienia się w ciągu cyklu, co wydaje się przemawiać za periodycznością degradacji cykliny E. Jakie są próby wytłumaczenia odmiennych poglądów na temat udziału białka SKP2 w degradacji cykliny E? Biorąc pod uwagę fakt, że w mysich komórkach bez genu *Skp2* cyklina E jednak nie ulega degradacji [34] sugerowany jest pośredni wpływ białka SKP2 na degradację cykliny E [48]. W komórkach, w których brak jest białka Skp2, może mieć miejsce wzrost poziomu białka p27 i w konsekwencji zahamowanie aktywności kinazy cdk2/cyklina E. Nie dochodziłoby wówczas do autofosforylacji cykliny E (będącej w kompleksie z kinazą cdk2) i rozpoznania jej przez białko hcdc4/Fbw7/Ago. Inna możliwość zakłada, że do interakcji cykliny E z białkiem adaptorowym SKP2 potrzebne są jeszcze inne, niezidentyfikowane do dziś białka [49].

Panuje zgodność poglądów co do tego, że ufosforylowanie treoniny w pozycji 380 w cząsteczce cykliny E będącej w kompleksie z kinazą cdk2 [34, 43, 45], a być może także i treoniny 62 [46], jest konieczne do jej rozpoznania przez odpowiednie białko Fbp. Nie jest jeszcze natomiast definitywnie wyjaśnione, czy fosforylacja jest także niezbędna przy ubikwytynacji i degradacji wolnej, nie związanej z kinazą cdk2, cykliny E [34]. Pełni ona także istotne funkcje regulacyjne jako na przykład aktywator receptorów estrogenowych.

Równie intensywnie jak degradacja cykliny E badana jest proteoliza **białka p27** (rodzina CIP/KIP), inhibitora kinaz cdk działających we wszystkich fazach cyklu komórkowego, przede wszystkim zaś kinazy cdk2 skompleksowanej z cykliną E. Ekspresję genu *p27* regulują liczne czynniki wzrostu, przy czym czynniki mitogenne wywołują spadek jego ekspresji, natomiast czynniki powodujące różnicowanie komórek lub hamujące ich wzrost są odpowiedzialne za wzrost ekspresji genu *p27* i ilości białka *p27* w komórce [50]. Poziom mRNA<sub>p27</sub> nie zmienia



Ryc. 4. Schemat ubikwitynacji cykliny E i białka p27, inhibitora kinaz cdk. W rozpoznaniu i wiązaniu ufosforylowanych cykliny E i p27 biorą udział dwa różne białka z motywem „F-box” (Skp2 i h/Cdc4/Ago/Fbw7). Na schemacie umieszczono też białko Cks1, którego udział w modulacji działania ligazy SCF na degradację białka p27 jest ostatnio postulowany. Zaznaczono również hamujące działanie p27 na kinazę cdk2/cyklina E i *vice versa* (w oparciu o 44 i 49).

się znacząco podczas cyklu komórkowego. Tak więc wewnątrzkomórkowy poziom białka p27 regulowany jest poprzez intensywność translacji mRNA [51, 52] i zwłaszcza, jak się sądzi już od 1995 roku, przez ściśle kontrolowaną jego proteolizę [53]. Gwałtowny spadek poziomu białka p27 ma miejsce po wyjściu komórek z fazy spoczynkowej G0 i włączeniu się ich do cyklu oraz podczas fazy G1, przed rozpoczęciem syntezy DNA. Ubikwitynację białka p27 przeprowadza ligaza SCF, a białkiem Fbp rozpoznającym p27 jest tu Skp2 [54-56].

Podobnie jak większość białek ubikwitynowanych przy udziale ligazy SCF, białko p27 przed rozpoznaniem przez białko Fbp (Skp2) musi zostać ufosforylowane. Wydaje się już dziś dobrze udokumentowane, że w cząsteczce p27 fosforylacji ulega treonina w pozycji 187, a główną kinazą fosforylującą p27 jest kinaza cdk2/cyklina E [50, 57], nie wyklucza się też działania kinazy cdk1/cyklina A [55, 58]. Wiosną 2001 roku doniesiono, że do efektywnej ubikwitynacji i degradacji p27 konieczne jest jeszcze jedno białko, tzw. białko Cks1 [59, 60]. Białko to zalicza się do znanej już od wielu lat rodziny białek Suc1/Cks, wiążących się z wieloma kinazami cdk [61, 62], a których działanie jako regulatorów

cyklu pozostawało dotychczas nieznanne. Publikowane ostatnio wyniki wyjaśniają, że białko Cks1 (ale nie inne białka z tej rodziny) wiąże się z białkiem adaptorowym Skp2 i zwiększa znacząco jego zdolność rozpoznawania i wiązania ufosforylowanego p27. Komentatorzy w *Science* piszą nawet obrazowo, że Cks1 jest właściwym czynnikiem, który „pociąga za spust” i wywołuje degradację p27 [63]. Różne są obecnie spekulacje o sposobach modulacji przez Cks1 efektywności działania SCF, a zwłaszcza działania białka Skp2. Przypuszcza się, że dołączenie go mogłoby wywoływać zmiany allosteryczne w Skp2, stabilizować interakcje pomiędzy Skp2 i p27 lub też ułatwiać właściwe umiejscowienie p27 w kompleksie ligazy SCF [63]. Które z tych przypuszczeń jest prawdziwe pokażą prawdopodobnie dalsze badania.

Komórki nowotworowe charakteryzuje na ogół niski poziom białka p27, (np. [64-66]), co wynika, jak się wydaje, z wysokiej wewnątrzkomórkowej aktywności proteolitycznej [47]. Przynajmniej w komórkach nowotworu jamy ustnej (ang. *oral squamous cell carcinoma*) obserwuje się zbieżność występowania niskiego poziomu białka p27 i zwiększonej ilości białka adaptorowego Skp2 [68].

Stosunkowo mniej niż o p27 wiadomo o mechanizmach degradacji innych inhibitorów kinaz cdk — białek p57 i p21, także z rodziny CIP/KIP. Wysłunięto sugestię, że **białko p57** ulegać może proteolizie w proteasomie, ponieważ w osteoblastach (stymulowanych do proliferacji przez TGF- $\beta$ ) nie następuje spadek jego poziomu po traktowaniu ich laktastatyną (inhibitorem działania proteasomu) [69]. Podobnie, laktastatyna stabilizuje **białko p21** w ludzkich komórkach nowotworu jelita grubego, RKO i HCT 116 [70, 71], wykrywane są też w nich ubikwitynowane pochodne p21 [72]. Dane te wskazują na prawdopodobieństwo degradacji p21 w proteasomie. Przypuszcza się, że w ubikwitynacji p21 bierze udział ligaza SCF, ponieważ białko p21 nagromadza się w komórkach (nowotwór jelita grubego RKO oraz ludzkie keratynocyty), do których wprowadzono nukleotydy antysensowne w stosunku do genów kodujących podjednostki tej ligazy - takie jak kullina oraz białka Skp1 i Skp2 [73]. W świetle powyższych obserwacji nie jest zrozumiały fakt, że do degradacji p21 w proteasomie nie jest niezbędna jego uprzednia ubikwitynacja [71]. Nie wiadomo więc czym można tłumaczyć zależność degradacji p21 od obecności SCF. Czy p21 jest kolejnym, podobnie jak dekarboksylaza ornitynowa [74, 75], przykładem nieubikwitynowanego białka degradowanego w proteasomie wykażą dalsze badania. Już teraz wiadomo, że interakcje p21 z innymi białkami i tworzenie z nimi wieloskładnikowych kompleksów wyraźnie modułują jego stabilność. Skompleksowanie p21 z kinazami cdk sprzyja jego degradacji, natomiast z jądrowym antygenem proliferujących komórek (PCNA) ochrania przed rozkładem w proteasomie [76].

### III-2.2. Cyklina D i inhibitory kinaz cdk z rodziny INK

**Cykliny D** (pozytywne regulatory cyklu) aktywują kinazy cdk4/6 działające w komórkach będących w fazie G1 cyklu i są przede wszystkim odpowiedzialne za fosforylację białka supresorowego Rb. W konsekwencji tego następuje uwolnienie czynnika transkrypcyjnego E2F-1, a to umożliwia jego działanie jako regulatora transkrypcji wielu genów. Ponadto, kompleksy kinaz cdk4/6 działają też nieenzymatycznie wychytując i tworząc wieloskładnikowe kompleksy z inhibitorem p27, dzięki czemu może działać kinaza cdk2/cyklina E [77].

Wewnątrzkomórkowy poziom cykliny D, zwłaszcza D1 i D3, regulowany jest na poziomie transkrypcji (zwłaszcza przez różne mitogeny [78]), jak również przez proteolizę zależną od ubikwityny i proteasomu. Już w 1996 roku zasugerowano, że to właśnie

obniżona degradacja cykliny D (występująca pomimo braku amplifikacji genów kodujących cykliny D i/lub zwiększenia poziomu odpowiednich mRNA [79]) może być przyczyną nadmiernej ich akumulacji w komórkach raka macicy SK-UT. Wydaje się obecnie udowodnione, że ubikwitynację cykliny D1 i D3 przeprowadza ligaza SCF [80, 81], a poziom białka adaptorowego Skp2 decyduje o intensywności ich degradacji w proteasomie [80, 82]. Fosforylacja treoniny 286 w cząsteczce cykliny D1 przez kinazę syntazy glikogenowej 3 $\alpha$  [83, 84], wywołuje przemieszczenie cykliny D1 z jądra do cytoplazmy, na terenie której zostaje ubikwitynowana. Związanie cykliny D1 z kinazą cdk4 sprzyja jej dalszej fosforylacji i ubikwitynacji, chociaż modyfikacji poprzez dołączenie ubikwityny może także ulegać niezwiązana z kinazami cdk i nieufosforylowana cyklina D1 [84, 85]. Sugeruje się, że może to być jednym ze sposobów usuwania cykliny D1 w określonych momentach cyklu komórkowego i regulowania tym samym stopnia ufosforylowania białka supresorowego Rb. Poznanie szlaków prowadzących do ubikwitynacji i degradacji wolnej cykliny D1 może być pomocne w podejmowaniu działań eliminujących efekty nadekspresji cykliny D1 występującej w licznych nowotworach [85].

Badania stabilności białkowych inhibitorów kinaz cdk z rodziny INK i działających w początkowych fazach cyklu są nieliczne. Jak dotąd, jedynie ubikwitynacja **białka p19**, którego najwyższy poziom obserwuje się w komórkach będących w fazie S [86], wydaje się dobrze udokumentowana. W komórkach ludzkich (ang. *osteosarcoma cell line* U-2-OS) wykazano bowiem pojawianie się jego pochodnych z kilkoma resztami ubikwityny [87]. Nieznana jest jeszcze ligaza ubikwitynowa biorąca udział w ubikwitynacji p19, lecz niewątpliwa jest stymulacja tego procesu w obecności kinazy cdk. Wydaje się to wskazywać na fosforylację białka p19 przed proteolizą.

### III-2.3. Czynniki transkrypcyjne E2F-1

W proteasomie ulega też degradacji czynnik transkrypcyjny **E2F-1**, aktywny przede wszystkim w komórkach wkraczających w fazę S oraz w komórkach będących już w fazie S. Reguluje on ekspresję genów kodujących białka konieczne do rozpoczęcia syntezy DNA [88, 89]. Ubikwitynację czynnika E2F-1 (następującą po odłączeniu od ufosforylowanego białka supresorowego pRb i/lub pokrewnych mu białek p107 i p130, [90, 93]), przeprowadza ligaza SCF współdziałająca z białkiem adaptorowym Skp2 [94].

Obserwuje się nawet czasową zbieżność wysokiego poziomu białka Skp2 w komórkach będących w fazie S, a intensywną proteolizą czynnika E2F-1 w komórkach znajdujących się na granicy faz S i G2. Brak jest jak dotąd danych wskazujących czy do rozpoznania i wiązania E2F-1 przez białko Skp2 niezbędne jest jego ufosforylowanie, jak to na ogół obserwowano w przypadku białek ubikwitynowanych przez ligazę SCF [89]. Są także sugestie, że degradacja E2F-1 w proteasomie nie jest jedyną drogą jego proteolizy. Świadczyć o tym może brak nagromadzenia się czynnika E2F-1 w komórkach nie zawierających genu kodującego białko adaptorowe Skp2 [34].

#### IV. Ligaza ubikwitynowa APC/C

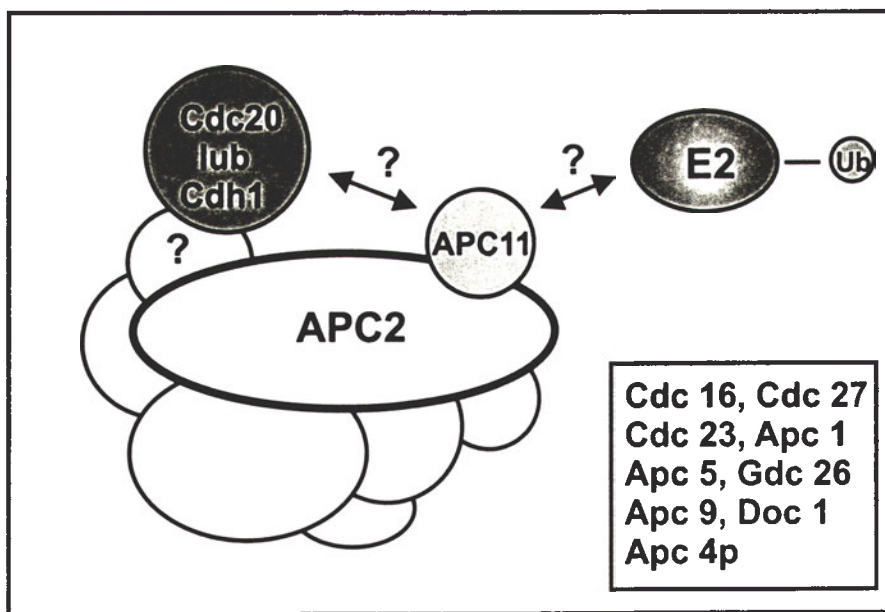
##### IV-1. Budowa i regulacja działania

Drugim kompleksem ligazowym, który jest istotny dla przebiegu cyklu komórkowego jest kompleks APC/C (ang. *Anaphase — Promoting — Complex / Cyclosome*), na który składa się w komórkach drożdży kilkanaście, a w komórkach wyższych organizmów eukariotycznych prawdopodobnie 10 podjednostek [95,96]. Stałymi składnikami kompleksu APC/C są białka APC2 i APC11 (Ryc. 5), homologiczne z kulliną oraz białkiem Rbx1/Roc1 w omawianej już ligazie SCF [98, 99]. Białko APC2 jest

stałych podjednostek nie jest nadal wyjaśnione. Zidentyfikowano w nich natomiast liczne sekwencje aminokwasowe (np. motywy WD40, WD7, TPR), które wskazują na możliwości wystąpienia określonych oddziaływań białko-białko [95, 96].

Regulacja funkcjonowania ligazy APC/C następuje przede wszystkim poprzez dołączanie określonych podjednostek regulatorowych — białek Cdc20/Fizzy lub Cdh1/Hct1/Fizzy-related, obecnych, jak się uważa, we wszystkich komórkach eukariotycznych [101-104]. W komórkach drożdży liczba białek regulatorowych jest prawdopodobnie większa. Wydaje się, że pełnią one funkcje analogiczne jak białka Fbp w ligazie SCF, nie występuje w nich jednak charakterystyczny motyw „F-box”. Charakteryzuje je natomiast obecność siedmiu domen WD, ale nie wiadomo czy właśnie poprzez te sekwencje dochodzić może do rozpoznania i wiązania białek mających ulec ubikwitynacji.

W różnych fazach cyklu występują różne kompleksy ligazy APC/C, co wynika, między innymi, z różnej ekspresji białek regulatorowych podczas cyklu. Kompleks ligazy APC/C z białkiem regulatorowym Cdc20, obecny w komórkach będących w mitozie, ubikwitynuje białka podczas metafazy i na początku anafazy, natomiast kompleks ligazy APC/C z białkiem regulatorowym Cdh1 rozpoczyna działanie w anafazie i kończy w fazie G1 następnego



Ryc. 5. Schemat budowy kompleksu ligazy APC/C. W ramce wymieniono białka, które mogą brać udział w tworzeniu kompleksu tej ligazy (w oparciu o 95 i 96).

podjednostką podstawową, do której dołączają się inne podjednostki, białko APC11 zaś pośredniczy, jak się sądzi, w interakcjach APC z odpowiednim enzymem E2, przenoszącym zaktywowaną ubikwitynę. Pomimo tego, że o występowaniu w komórkach kompleksu ligazy APC/C wiadomo już od 1995 roku [100], znaczenie funkcjonalne większości pozostających

cyklu (Ryc. 5). Ufosforylowanie zarówno kompleksu APC, jak i białek regulatorowych, jest istotne dla działania ligazy APC/C. Fosforylacji podjednostek APC/C dokonują głównie te kinazy cdk, które zaczynają być aktywne w komórkach będących w fazie G2 i stają się w pełni aktywne w komórkach podczas mitozy [105-107]. W procesie tym uczestniczą także

tw. kinazy *Polo* ([108], np. kinaza kodowana w komórkach drożdży przez gen *cdc5*), a także kinaza białkowa A [109]. Fosforylacja może zarówno aktywować ligazę APC/C, jak i hamować jej działanie. Przypuszczalnie można to wiązać z różnym umiejscowieniem w kompleksie ufosforylowanych reszt aminokwasowych, które, jak dotąd, nie zostały jeszcze zidentyfikowane [96]. Przypuszcza się także, że białko *Suc 1*, promujące fosforylacje takich regulatorów cyklu jak fosfataza *cdc25* czy kinaza *Wee 1* [61, 62], może brać udział w fosforylacji APC/C, stając się być może łącznikiem pomiędzy kinazami cdk i kompleksem APC/C [95].

Również białka regulatorowe *Cdc20* i *Cdh1* są fosforylowane, prawdopodobnie przez kinazy cdk. Sądzi się, że fosforylacja *Cdc20* nie jest jednak konieczna, by białko to aktywowało APC/C [102, 103, 110]. Natomiast w przypadku białka *Cdh1* wykazano, że ufosforylowanie go przez kinazy *cdk1* i *cdk2* znosi jego zdolność do łączenia się z ligazą APC/C [106, 111-113]. Reaktywację *Cdh1* przeprowadza fosfataza, kodowana w drożdżach *S. cerevisiae* przez gen *cdc14*. Homologiczne białko zostało także wykryte w komórkach kręgowców [113]. Fosfataza *Cdc14* obecna jest w jąderku [114], w kompleksie ze specyficznym inhibitorem, białkiem *Cfi1/Net1* [115, 116]. Jak doniesiono ostatnio, uwolnienie fosfatazy *Cdc14* z kompleksu z inhibitorem *Cfi1/Net1* i jej translokacja do cytoplazmy wymaga współdziałania wielu białek [117]. Regulacja aktywności kompleksu APC/C przez fosforylację jest zatem, jak widać, bardzo złożona i w tym opracowaniu została tylko zasygnalizowana.

## IV-2. Substraty ligazy APC

W odróżnieniu od ligazy SCF ligaza APC/C dołącza ubikwitynę do niewielu substratów i dokonuje tego współdziałając nie z jednym, lecz z dwoma białkami E2, w zależności od momentu, w którym działa i od rodzaju białkowego substratu [96]. Białka będące substratami APC/C charakteryzuje obecność tzw. boksów destrukcyjnego, sekwencji aminokwasowej opisanej po raz pierwszy w cyklinach mitotycznych na początku lat dziewięćdziesiątych [118, 119]. Jest on niezbędny, jak się powszechnie sądzi, do rozpoznania przez ligazę APC/C i określone białko E2 białka mającego ulec degradacji. Mutacje w boksie destrukcyjnym lub też brak tej sekwencji aminokwasowej wywołują stabilizację białek i zatrzymanie procesów, w których uczestniczą. Wydaje się także, że sekwencja aminokwasowa KEN występująca w niektórych białkach, może być również konieczna do

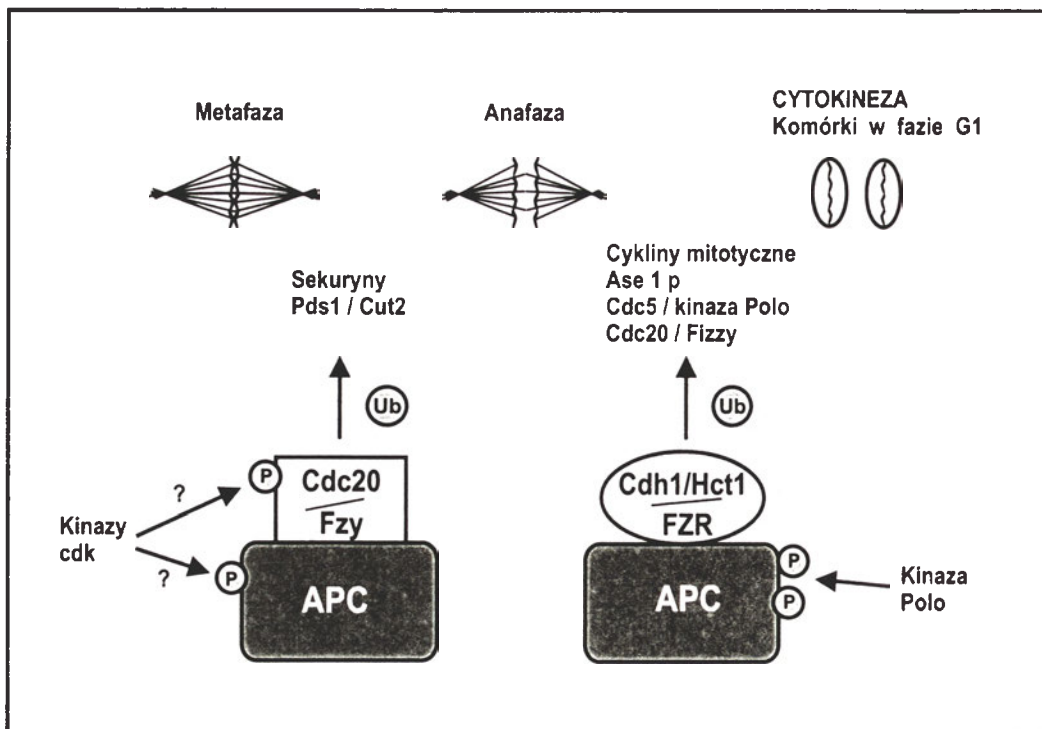
ich rozpoznania i ubikwitynacji przez ligazę APC/C skompleksowaną z białkiem regulatorowym *Cdh1* [120].

Ligaza APC/C ubikwitynuje przede wszystkim białka bezpośrednio zaangażowane w przebieg mitozy, takie jak inhibitor anafazy i rozdziału chromatyd (*Pds1/Cut2*), czy też cykliny A i B stanowiące podjednostki regulatorowe kinaz *cdk1* i *cdk2*, które działają głównie podczas mitozy. Przy jej udziale degradowane są również jej własne białka regulatorowe — białko *Cdc20* i kinaza *Polo/Cdc5* (pod koniec anafazy w fazie G1), białko *Ase1* wiążące się z mikrotubulami, niezbędne dla prawidłowego funkcjonowania wrzeciona mitotycznego [121], a także geminina uczestnicząca w regulacji syntezy DNA.

### IV-2.1. Białka *Pds1/Cut2*

Głównym substratem ubikwitynowanym przez ligazę APC/C jest białko będące inhibitorem rozpoczęcia anafazy i nazwane białkiem **Pds1** w *S. cerevisiae* [107, 122, 123] i *Cut2* w *S. pombe* [124, 125]. Homologi tego białka zidentyfikowano dotychczas także w komórkach *Drosophila melanogaster* (białko *Pimple* [126]) i komórkach kręgowców (białko *PTTG* [127, 128]). Zalicza się je do tzw. sekuryń [128], białek niezbędnych do utrzymywania stabilności chromosomów. Obecność ich uniemożliwia bowiem przedwczesny rozdział chromatyd. W komórkach *S. cerevisiae* sekuryna *Pds1* jest degradowana w okresie pomiędzy metafazą a anafazą, po ubikwitynacji przez ligazę APC/C współdziałającą z białkiem regulatorowym *Cdc20* [130] (Ryc. 6). Natomiast w komórkach ludzkich może także w procesie tym uczestniczyć drugie białko regulatorowe, *Cdh1* [128].

Jednakże to nie sekuryna *Pds1* jest czynnikiem spajającym chromatydy. Za sparowanie chromatyd odpowiedzialne są inne białka, tzw. kohezyny [131], kodowane w komórkach drożdży przez co najmniej 6 genów (geny *Smc* i *Scs*). O degradacji kohezyn decydują separtyry, białka *Esp1* w *S. cerevisiae* [132, 133] i *Cut1* w *S. pombe* [125]. W okresie przed rozdziałem chromatyd separtyry są nieaktywne, gdyż są związane w kompleksie z sekuryną *Pds1* [133, 134]. Degradacja *Pds1* uwalnia separtyry z kompleksu, które w niewyjaśniony jeszcze sposób, powodują odysocjowanie od chromatyd kohezyn (zwłaszcza kohezyny *Scs1* [134]), co sprawia, że może nastąpić ich rozdzielanie. Czy separtyry, których struktura nie przypomina znanych proteaz, mają aktywność proteolityczną pozostaje do wyjaśnienia [135, 136]. W świetle powyższych danych degradację *Pds1* można więc traktować jako niezbędny warunek do tego,



Ryc. 6. Udział ligazy APC/C w ubikwitynacji białek podczas mitozy. Zaznaczono różne białka regulatorowe (Cdc20/FZY i Cdh1/Hct1/FZR) biorące udział w rozpoznawaniu określonych substratów oraz różne kinazy fosforylujące podjednostki kompleksu (z danych 96).

ażeby doszło do rozdziału chromatyd, nie zaś jako czynnik bezpośrednio wywołujący ten proces.

Rozdział chromatyd i zapoczątkowanie anafazy, będące wynikiem ciągu przemian, w których uczestniczy ligaza APC/C, są działaniami nieodwracalnymi. Ich precyzyjne wykonanie decyduje zatem w dużej mierze o utrzymaniu stabilności genomu w dzielących się komórkach. Są one precyzyjnie monitorowane przez „mechanizm nadzorczy” (ang. *surveillance*), nazwany punktem kontrolnym powstawania wrzeciona podziałowego. Aktywacja tego mechanizmu\*, następująca np. przy niewłaściwym ułożeniu chromatyd, powoduje zahamowanie działania ligazy APC/C przez określone grupy białek i blokuje przebieg mitozy [135, 137].

#### IV-2.2. Cykliny mitotyczne

Fakt, że degradacja cyklin mitotycznych A i B, stanowiących podjednostki regulatorowe kinaz cdk2 i cdk1, które działają przede wszystkim w komórkach będących w mitozie, zależy od ubikwityny i zachodzi w mitozie, znany jest już od ponad 10 lat (patrz [138]). W cyklinach tych po raz pierwszy zidentyfikowano tzw. boks destrukcyjny, sekwencję dziewięciu aminokwasów w N-końcu cząsteczki [118]. Pewne niewielkie różnice w rodzaju amino-

kwasów występujące w boksach destrukcyjnych cyklin A i B przyczyniają się, być może, do wcześniejszej degradacji cykliny A niż cykliny B podczas mitozy [139, 140]. Początek degradacji cykliny A przypada na początek mitozy, koniec zaś przed rozpoczęciem anafazy (przed segregacją chromatyd). Rozkład cykliny B ma miejsce w późniejszych stadiach mitozy i przynajmniej w komórkach ssaków trwa aż do początku fazy S [142].

Panuje zgodność co do tego, że ubikwitynację cyklin mitotycznych przeprowadza ligaza APC/C. Natomiast udział poszczególnych podjednostek regulatorowych w rozpoznaniu i interakcji z określonymi cyklinaami nie jest jeszcze definitywnie wyjaśniony [96]. W komórkach drożdży jedna z cyklin B (Clb5), ubikwitynowana jest przez kompleks APC/Cdc20, inne zaś cykliny B (Clb3 i Clb2), przez kompleks APC/Cdh1 [143]. W komórkach wyższych organizmów eukariotycznych w ubikwitynacji cykliny A uczestniczyć może ligaza APC/C we współdziałaniu zarówno z Cdc20, jak i Cdh1, zaś cykliny B przede wszystkim Cdh1 (Ryc. 6) [140]. W białku Cdh1 wykazano ostatnio nawet obecność określonej domeny aminokwasowej, odpowiedzialnej za jego interakcję z cyklinaami [144]. Spowodowany degradacją cyklin mitotycznych spadek aktywności odpowiednich ki-

\*Grzelakowska-Sztabert B. (2002) *Post Biol Kom* 29: 157-175.

naz cdk jest niezbędny do zakończenia przez komórki mitozy i rozpoczęcia przez nie fazy G1.

Odkrycie sekwencyjności proteolizy cyklin podczas mitozy i tym samym selektywnego wyłączenia aktywności określonych kinaz cdk, jak również fakt regulowania przez kinazy cdk aktywności ligazy APC/C, są niezmiernie istotne dla zrozumienia złożonych mechanizmów decydujących o zakończeniu cyklu podziałowego.

#### IV-2.3. Geminina

Jednym z intensywniej badanych ostatnio substratów ligazy APC jest **geminina**, małe jądrowe białko wykryte w wielu komórkach eukariotycznych, w tym w komórkach ludzkich [145]. Bierze ona udział w regulacji rozpoczęcia syntezy DNA w fazie S i hamuje formowanie kompleksu prereplikacyjnego (pre-RC). Kompleks ten tworzy wiele białek, w tym dołączane w określonej kolejności białka ORC (ang. *origin recognition complex*), białko Cdc6/18 oraz zespół białek MCM (ang. *minichromosomes maintenance*). W złożonym procesie powstawania kompleksu pre-RC, geminina współdziała z białkiem Ctd1 [146-148] i uniemożliwia rozpoczęcie replikacji DNA w niewłaściwych momentach cyklu (ang. *origin refiring*). Najwyższy poziom gemininy mają komórki we wczesnych stadiach mitozy, degradacja zaś tego inhibitora, zależna od ubikwityny i ligazy APC/C, następuje później, w okresie pomiędzy metafazą a anafazą. W badaniach tych uczestniczy zespół tegorocznego noblisty, prof. Nurse'a [146, 147].

#### V. Ligaza VBC-CUL2

Ligazą ubikwitynową „spokrewnioną” zarówno z ligazą SCF jak i APC wydaje się być kompleks białkowy nazwany VBC-CUL2, w którym jedną z podjednostek jest białko kodowane przez gen supresorowy VHL. Tworzą go kullina 2, elongina B/C (analog Skp1 w ligazie SCF), białko Rbx1 oraz wspomniane już białko pVHL [29, 149-151]. Białko pVHL funkcjonuje prawdopodobnie w sposób podobny jak białka adaptorowe z motywem „F-box”, a w jego cząsteczce występuje pokrewna „F-box” domena SOCS [152]. Dotychczas jedynym znanym białkiem wiążącym się z pVHL i ubikwitynowanym przez ligazę VBC-CUL2 są czynniki transkrypcyjne HIF-1 $\alpha$  i HIF-1 $\beta$ , uczestniczące w regulacji ekspresji genów indukowanych w komórkach podczas niedotlenienia, np. czynnik wzrostu komórek endotelialnych, VEGF [153, 154]. W wyniku braku białka pVHL lub w obecności jego zmutowanych form, sytuacji występującej w chorobie von Hippel-Lindau

(VHL), dochodzi do zaburzenia działania omawianej ligazy i w efekcie do konstytutywnej ekspresji HIF i aktywacji transkrypcji genów kodujących VEGF. Sprzyja to procesom angiogenezy i powstawaniu nowotworów, zwłaszcza nowotworów nerek [155]. Sugerowany też jest, ale nie udowodniony, udział ligazy VBC-CUL2 w ubikwitynacji białek niezbędnych dla zakończenia przez komórki cyklu podziałowego [152]. Sugestia ta usprawiedliwia, moim zdaniem, umieszczenie ligazy VBC-CUL2 w niniejszym opracowaniu.

#### VI. Uwagi końcowe

W artykule omówiono udział intensywnie badanej w ostatnich latach proteolizy białek bezpośrednio uczestniczących w progresji cyklu komórkowego. Z pewnością w opracowaniu tym uwzględniono nie wszystkie białka istotne dla prawidłowego przebiegu cyklu. Tak np. nie przedyskutowano nielicznych danych dotyczących fosfatazy Cdc25, głównego aktywatora kinaz cdk. Ostatnio doniesiono, że o jej stabilności decyduje intensywność ubikwitynacji [156], nie zidentyfikowano jednak dotąd ligazy przeprowadzającej ten proces. Należy też pamiętać, że proteoliza wielu innych białek, w tym kodowanych przez geny supresorowe, jest również niezmiernie istotna dla przebiegu cyklu.

Artykuł otrzymano 8 listopada 2001  
Zaakceptowano do druku 3 grudnia 2001

#### Piśmiennictwo

1. Hochstrasser M (1996) *Cell* **84**: 813-815
2. Hicke L (1999) *Trends Cell Biol* **9**: 107-112
3. Hicke L (2001) *Cell* **106**: 527-530
4. Jentsch S, Schlenker S (1995) *Cell* **82**: 881-884
5. Pickart CM (1997) *FASEB J* **11**: 1055-1066
6. Kirschner M (1999) *Trends Biochem Sci* **24**: M42-M45
7. Voges D, Zwickl P, Baumeister W (1999) *Annu Rev Biochem* **68**: 1015-1068
8. Wójcik C (2001) *Trends Cell Biol* **11**: 397-399
9. Ciechanover A (1998) *EMBO J* **17**: 7151-7160
10. Piotrowska U (1993) *Post Biochem* **39**: 8-16
11. Tobiasz A, Żołądek T (1997) *Post Biochem* **43**: 91-97
12. Peters J-M (1998) *Curr Opin Cell Biol* **10**: 759-768
13. Koepf DM, Harper JW, Elledge SJ (1999) *Cell* **97**: 431-434
14. Elledge SJ, Harper JW (1998) *Biochim Biophys Acta* **1377**: M61-M70
15. Yew P R (2001) *J Cell Physiol* **187**: 1-10
16. Schwob E, Bohm T, Mendenhall MD, Nasmyth K (1994) *Cell* **79**: 233-244
17. Schneider BL, Yang Q-H, Futcher AB (1996) *Science* **272**: 560-562
18. Willems AR, Lancker S, Patton EE, Craig KL, Nasson TF, Mathias N, Kobayashi R, Wittenberg c, Tyers M (1996) *Cell* **86**: 453-463

19. Lanker S, Valdivieso MH, Wittenberg C (1996) *Science* **271**:1597-1601
20. Hershko A (1997) *Curr Opin Cell Biol* **9**: 788-799
21. Kipreous ET, Lander LE, Wing JP, He WW, Hedgecock EM (1996) *Cell* **85**: 829-839
22. Lisztwan J, Marti A, Sutterluty H, Gstaiger M, Wirbelauer C, Krek W (1998) *EMBO J* **17**: 368-383
23. Cenciarelli C, Chiaur DS, Guardavaccaro D, Parks W, Vidal M, Pagano M (1999) *Curr Biol* **9**: 1177-1179
24. Skowyra D, Craig KL, Tyers M, Elledge SJ, Harper JW (1997) *Cell* **91**: 209-219
25. Winston JT, Koepp DM, Zhu C, Elledge SJ, Harper JW (1999) *Curr Biol* **9**: 1180-1182
26. Bai C, Hofmann K, Ma L, Goebel M, Harper JW, Elledge SJ (1996) *Cell* **86**: 263-274
27. Patton EE, Willems AR, Tyers M (1998) *Trends Genet* **14**: 236-243
28. Skowyra D, Koepp DM, Kamura T, Conrad MN, Conaway RC, Conaway JW, Elledge SJ, Harper JW (1999) *Science* **284**: 662-665
29. Kamura T, Koepp DM, Conrad MN, Skowyra D, Moreland RJ, Iliopoulos O, Lane WS, Kaelin WG, Elledge SJ, Conaway RC, Harper JW, Conaway JW (1999) *Science* **284**: 657-661
30. Patton EE, Willems AR, Sa D, Kuras L, Thomas D, Craig KL, Tyers M (1998) *Genes Dev* **12**: 692-705
31. Schulman BA, Carrano AC, Jeffrey PD, Bowen Z, Kinnucan ERE, Finnin MS, Elledge SJ, Harper JW, Pagano M, Pavletich NP (2000) *Nature (Lond)* **408**: 381-386
32. Neer EJ, Schmidt CJ, Nambudripad R, Smith TF (1994) *Nature (Lond)* **371**: 297-300
33. Kobe B, Deisenhofer J (1994) *Trends Biochem Sci* **19**: 415-421
34. Nakayama K-I, Hatakeyama S, Nakayama K (2001) *Biochem Biophys Res Commun* **282**: 853-860
35. Hueber AO, Evan GI (1998) *Trends Genet* **14**: 364-367
36. Dang CHV (1999) *Mol Cell Biol* **19**: 1-11
37. Nasi S, Ciarapica R, Jucker R, Rosati J, Soucek L (2001) *FEBS Lett* **490**: 153-162
38. O'Hagan RC, Ohh M, David G, Moreno de Alboran I, Alt FW, Kaelin Jr WG, DePinho RA (2000) *Genes Dev* **14**: 2185-2191
39. Mamillapalli R, Gavrilova N, Mihaylova VT, Tsvetkov LM, Wu H, Zhang H, Sun H (2000) *Curr Biol* **11**: 263-267
40. Feldman RM, Correll CC, Kaplan KB, Deshaies RJ (1997) *Cell* **91**: 221-230
41. Li FN, Johnston M (1997) *EMBO J* **16**: 5629-5638
42. Spruck CH, Won KA, Reed SI (1999) *Nature (Lond)* **401**: 297-300
43. Nakayama K, Nagahama H, Minamishima YA, Matsumoto M, Nakamichi I, Kitagawa K, Shirane M, Tsunematsu R, Tsukiyama T, Ishida N, Kitagawa M, Nakayama K, Hatakeyama S (2000) *EMBO J* **19**: 2069-2081
44. Bartek J, Lukas J (2001) *Science* **294**: 66-67
45. Yeh K-H, Kondo T, Zheng J, Tsvetkov LM, Blair J, Zhang H (2001) *Biochim Biophys Res Commun* **281**: 884-890
46. Strohmaier H, Spruck CH, Kaiser P, Won K-A, Sangfelt O, Reed SI (2001) *Nature (Lond)* **413**: 316-322
47. Koepp DM, Schaefer LK, Ye X, Keyomarsi K, Chu C, Harper JW, Elledge SJ (2001) *Science* **294**: 173-177
48. Moberg KH, Bell DW, Wahrer DCR, Haber DA, Hariharan IK (2001) *Nature (Lond)* **413**: 311-316
49. Schwab M, Tyers M (2001) *Nature (Lond)* **413**: 268-269
50. Slingerland J, Pagano M (2000) *J Cell Physiol* **183**: 10-17
51. Hengst L, Reed SJ (1996) *Science* **271**: 1861-1864
52. Millard SS, Yan JS, Nguyen H, Pagano M, Kiyokawa H, Koff A (1997) *J Biol Chem* **272**: 7093-7098
53. Pagano M, Tam SW, Theodoras AM, Beer-Romero P, Del Sal G, Chau V, Yew PR, Draetta GF, Rolfe M (1995) *Science* **269**: 682-685
54. Carrano AC, Eytan E, Hersko A, Pagano M (1999) *Nat Cell Biol* **1**: 193-199
55. Amati B, Vlach J (1999) *Nat Cell Biol* **1**: E91-E93
56. Sutterluty H, Chatelain E, Marti A, Wirbelauer C, Senften M, Muller U, Krek W (1999) *Nat Cell Biol* **1**: 207-214
57. Sheaff RJ, Groudine M, Gordon M, Roberts JM, Clurman BE (1997) *Genes Dev* **11**: 1464-1478
58. Montagnoli A, Fiore F, Eytan E, Carrano AC, Draetta GF, Hershko A, Pagano M (1999) *Genes Dev* **13**: 1181-1189
59. Ganoth D, Bornstein G, Ko TK, Larsen B, Tyers M, Pagano M, Hershko A (2001) *Nat Cell Biol* **3**: 321-324
60. Spruck C, Strohmaier H, Watson M, Smith AP, Ryan A, Krek TW, Reed SI (2001) *Mol Cell* **7**: 639-650
61. Patra D, Dunphy WG (1998) *Genes Dev* **12**: 2549-2559
62. Patra D, Wang SX, Kumagai A, Dunphy WG (1999) *J Biol Chem* **274**: 36839-36842
63. Bartek J, Lukas J (2001) *Nat Cell Biol* **3**: E95-E98
64. Cariou S, Catzavelos C, Slingerland JM (1998) *Breast Cancer Res* **52**: 29-41
65. Catzavelos C, Bhattacharya N, Ung YC, Wilson JA, Roncari L, Sandhu C, Shaw P, Yeger H, Morava-Protzner I, Kapusta L, Franssen E, Pritchard KI, Slingerland JM (1997) *Nat Med* **3**: 227-230
66. Catzavelos C, Tsao MS, DeBoer G, Bhattacharya N, Shepherd FA, Slingerland JM (1999) *Cancer Res* **59**: 684-688
67. Loda M, Cukor B, Tam SW, Lavin P, Fiorentino M, Draetta GF, Jessup JM, Pagano M (1997) *Nad Med* **3**: 231-234
68. Gstaiger M, Jordan R, Lim M, Catzavelos C, Meztan J, Slingerland J, Krek W (2001) *Proc Natl Acad Sci USA* **98**: 5043-5048
69. Urano T, Yashiroda H, Muraoka M, Tanaka K, Hosoi T, Inoue S, Ouchi Y, Toyoshima H (1999) *J Biol Chem* **274**: 12197-12200
70. Blagosklonny MV, Wu GS, Omura S, el-Deiry WS (1996) *Biochim Biophys Res Commun* **227**: 564-569
71. Sheaff RJ, Singer JD, Swanger J, Smitherman M, Roberts JM, Clurman BE (2000) *Mol Cell* **5**: 403-410
72. Maki CG, Howley PM (1997) *Mol Cell Biol* **17**: 355-363
73. Yu ZK, Gervais JL, Zhang H (1998) *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 11324-11329
74. Manteuffel-Cymborowska M (1996) *Post Biochem* **42**: 113-120
75. Ciechanover A, Schwartz AL (1998) *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 2727-2730
76. Cayrol C, Ducommun B (1998) *Oncogene* **17**: 2437-2444
77. Cheng M, Olivier P, Diehl JA, Fero M, Roussel MF, Roberts JM, Sherr CJ (1999) *EMBO J* **18**: 1571-1583
78. Grzelakowska-Sztabert B (1996) *Post Biochem* **42**: 99-107
79. Welcker M, Lukas J, Strauss M, Bartek J (1996) *Oncogene* **13**: 419-425
80. Russell A, Thompson MA, Hendley J, Trutr L, Armes J, Germain D (1999) *Oncogene* **18**: 1983-1991
81. Russell A, Hendley J, Germain D (1999) *Oncogene* **18**: 6454-6459
82. Ganiatsas S, Dow R, Thopson A, Schulman B, Germain D (2001) *Oncogene* **20**: 3641-3650
83. Diehl JA, Zindy F, Sherr CJ (1997) *Genes Dev* **11**: 957-972
84. Diehl JA, Cheng M, Roussel MF, Sherr CJ (1998) *Genes Dev* **12**: 3499-3511
85. Germain D, Russell A, Thompson A, Hendley J (2000) *J Biol Chem* **275**: 12074-12079
86. Hirai H, Russel MF, Kato JY, Ashmun RA, Sherr CJ (1995) *Mol Cell Biol* **15**: 2672-2681



87. Thullberg M, Bartek J, Lukas J (2000) *Oncogene* **19**: 2870-2876
88. Weinberg RA (1996) *Cell* **85**: 457-459
89. Harper JW, Elledge SJ (1999) *Nat Cell Biol* **1**: E5-E7
90. Hofmann F, Martelli F, Livingston DM, Wang Z (1996) *Genes Dev* **10**: 2949-2959
91. Campanero MR, Flemington EK (1997) *Proc Natl Acad Sci USA* **94**: 2221-2226
92. Hateboer G, Kerkhoven RM, Shvarts R, Bernards R, Beijersbergen RL (1996) *Genes Dev* **10**: 2960-2970
93. Dyson N (1998) *Genes Dev* **12**: 2245-2262
94. Marti A, Wirbelauer C, Scheffner M, Krek W (1999) *Nat Cell Biol* **1**: 14-19
95. Zachariae W, Nasmyth K (1999) *Genes Dev* **13**: 2039-2058
96. Page AM, Hieter P (1999) *Annu Rev Biochem* **68**: 583-609
97. Peters JM (1999) *Exp Cell Res* **248**: 339-349
98. Zachariae W, Schevchenko A, Andrews PD, Ciosk R, Galova M, Stark MJR, Mann M, Nasmyth K (1998) *Science* **279**: 1216-1219
99. Yu H, Peters J-M, King RW, Page AM, Hieter P, Kirschner MW (1998) *Science* **279**: 1219-1222
100. Sudakin V, Ganoth D, Dahan A, Heller H, Hershko J, Luca FC, Ruderman JV, Hershko A (1995) *Mol Biol Cell* **6**: 185-197
101. Visintin R, Prinz S, Amon A (1997) *Science* **278**: 460-463
102. Weinstein J (1997) *J Biol Chem* **272**: 28501-28511
103. Kramer ER, Gieffers C, Holz G, Hengstschlager M, Peters JM (1998) *Curr Biol* **8**: 1207-1210
104. Schwab M, Lutum AS, Seufert W (1997) *Cell* **90**: 683-693
105. Lavah-Baratz S, Sudakin V, Ruderman JV, Hershko A (1995) *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 9303-9307
106. Zachariae W, Schwab M, Nasmyth K, Seufert W (1998) *Science* **282**: 1721-1724
107. Cohen-Fix O, Peters JM, Kirschner MW, Koshland D (1996) *Genes Dev* **10**: 3081-3093
108. Glover DM, Hagan IM, Tavares AAM (1998) *Genes Dev* **12**: 3777-3787
109. Kotani S, Tugendreich S, Fujii M, Jorgensen PM, Watanabe N, Hoog C, Hieter P, Todokoro K (1998) *Mol Cell* **1**: 371-380
110. Lorca T, Castro A, Martinez AM, Vigneron S, Morin N, Sigrist S, Lehner C, Doree M, Labbe JC (1998) *EMBO J* **17**: 3565-3575
111. Jaspersen SL, Charles JF, Tinker-Kulberg RL, Morgan DO (1998) *Mol Biol Cell* **9**: 2803-2817
112. Jaspersen SL, Charles JF, Morgan DO (1999) *Curr Biol* **9**: 227-236
113. Listovsky T, Zor A, Laronne A, Brandeis M (2000) *Exp Cell Res* **255**: 184-191
114. Bachant JB, Elledge SJ (1999) *Nature* **398**: 757-758
115. Taylor GS, Liu Y, Baskerville C, Charbonneau H (1997) *J Biol Chem* **272**: 24054-24063
116. Visintin R, Craig K, Hwang ES, Pronz S, Tyers M, Amon A (1998) *Mol Cell* **2**: 709-718
117. Visintin R, Amon A (2001) *Mol Biol Cell* **12**: 2961-2974
118. Glotzer M, Murray AW, Kirschner MW (1991) *Nature (Lond)* **349**: 132-138
119. Yamano H, Tsurumi C, Gannon J, Hunt T (1998) *EMBO J* **17**: 5670-5678
120. Pflieger CM, Kirschner MW (2000) *Genes Dev* **14**: 655-665
121. Juang YL, Huang J, Peters JM, McLaughlin ME, Tai CY, Pellman D (1997) *Science* **275**: 1311-1314
122. Yamamoto A, Guacci V, Koshland D (1996) *J Cell Biol* **133**: 85-97
123. Yamamoto A, Guacci V, Koshland D (1996) *J Cell Biol* **133**: 99-110
124. Funabiki H, Yamano H, Kumada K, Nagao K, Hunt T, Yanagida M (1996) *Nature (Lond)* **381**: 438-441
125. Funabiki H, Kumada K, Yanagida M (1996) *EMBO J* **15**: 6617-6628
126. Stratmann R, Lehner CF (1996) *Cell* **84**: 25-35
127. Zou H, McGarry TJ, Bernal T, Kirschner MW (1999) *Science* **285**: 418-422
128. Zur A, Brandeis M (2001) *EMBO J* **20**: 792-801
129. Jallepalli PV, Waizenegger IC, Bunz F, Langer S, Speicher MR, Peters J-M, Kinzler KW, Vogelstein B, Lengauer C (2001) *Cell* **105**: 445-457
130. Cohen-Fix O, Koshland D (1999) *Genes Dev* **13**: 1950-1959
131. Michaelis C, Ciosk R, Nasmyth K (1997) *Cell* **91**: 35-45
132. Nasmyth K (1999) *Trends Biochem Sci* **24**: 98-104
133. Ciosk R, Zachariae W, Michaelis C, Shevchenko A, Mann M, Nasmyth K (1998) *Cell* **93**: 1067-1076
134. Yanagida M (2000) *Genes Cells* **5**: 1-8
135. Uhlmann F, Lottspeich F, Nasmyth K (1999) *Nature (Lond)* **400**: 37-42
136. Murray A (1999) *Nature (Lond)* **400**: 19-
137. Nasmyth K, Peters J-M, Uhlmann F (2000) *Science* **288**: 1379-1384
138. Grzelakowska-Sztabert B (1993) *Post Biochem* **39**: 16-25
139. Klotzbucher A, Stewart E, Harrison D, Hunt T (1996) *EMBO J* **15**: 3053-3064
140. Geley S, Kramer E, Gieffers C, Gannon J, Peters JM, Hunt T (2001) *J Cell Biol* **153**: 137-148
141. Sigrist S, Jacobs H, Stratmann R, Lehner CF (1995) *EMBO J* **14**: 4827-4838
142. Brandeis M, Hunt T (1996) *EMBO J* **15**: 5280-5289
143. Shirayama M, Tóth A, Gálová M, Nasmyth K (1999) *Nature (Lond)* **402**: 203-207
144. Sřrensen SC, Lukas C, Kramer ER, Peters J-M, Bartek J, Lukas J (2001) *Mol Cell Biol* **21**: 3692-3703
145. McGarry TJ, Kirschner MW (1998) *Cell* **93**: 1043-1053
146. Wohlschlegel J, Dwyer B, Dhar SK, Walter JC, Dutta A (2000) *Science* **290**: 2309-
147. Lygerou Z, Nurse P (2000) *Science* **290**: 2271-2273
148. Nishitani H, Lygerou Z, Nishimoto T, Nurse P (2000) *Nature (Lond)* **404**: 625-628
149. Lisztwan J, Imbert G, Wirbelauer C, Gstaiger M, Krek W (1999) *Genes Dev* **13**: 1822-1833
150. Iwai K, Yamanaka K, Kamura T, Minato N, Conaway RC, Conaway JW, Klausner RD, Pause A (1999) *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 12436-12441
151. Tyers M, Willems AR (1999) *Science* **284**: 601-604
152. Tyers M, Rottapel R (1999) *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 12230-12232
153. Maxwell PH, Wiesener MS, Chang G-W, Clifford SC, Vaux EC, Cockman ME, Wykoff CC, Pugh CW, Maher ER, Ratcliffe PJ (1999) *Nature (Lond)* **399**: 271-275
154. Clifford SC, Astuti D, Hooper L, Maxwell PH, Ratcliffe PJ, Maher ER (2001) *Oncogene* **20**: 5067-5074
155. Clifford SC, Maher ER (2001) *Adv Cancer Res* **82**: 85-105
156. Bernardi R, Liebermann DA, Hoffman B (2000) *Oncogene* **19**: 2447-2454

# Batracylina (BAT) — potencjalny lek przeciwnowotworowy

## Batracylin (BAT) — potential of anticancer drug

KRYSTYNA DZIERZBICKA<sup>1</sup>, JAROSŁAW KAWULA<sup>2</sup>, ALEKSANDER M. KOŁODZIEJCZYK<sup>3</sup>

### Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Batracylina (BAT) — 8-aminoizoindolo[1,2-b]-chinazolino-12(10H)-on
- III. Rola *N*-acetylowania w procesie metabolizmu batracyliny
- IV. Aktywność przeciwnowotworowa BAT i jej analogów
- V. Podsumowanie

### Contents:

- I. Introduction
- II. Batracylin (BAT) — 8-aminoisoindolo[1,2-b]quinazolin-12(10H)-one
- III. The role of *N*-acetylation in metabolism process of batracylin
- IV. Antitumor activity of BAT and it's analogues
- V. Conclusions

**Wykaz stosowanych skrótów:** ABAT — *N*-acetylo-batracylina (*N*-acetylo-BAT); ATP — adenozy-5'-trifosforan; BAT — batracylina (8-aminoizoindolo[1,2-b]-chinazolino-12(10H)-on); colon — nowotwór okrężnicy; Cy 233 — cis-platyna 233; CYP3A — klasa cytochromów P450; HL-60 — ludzka promielocytowa białaczka (human promyelocytic leukemia); HPLC — wysokosprawna chromatografia cieczowa; LD<sub>50</sub> — 50% dawka śmiertelna (ang. 50% *lethal dose*); MDP — muramylo-dipeptyd (*N*-acetylo-muramylo-L-alanylo-D-izoglutamina); NAT1 — *N*-acetylotransferaza 1; NAT2 — *N*-acetylotransferaza 2; NCI — Narodowy Instytut Przeciwnowotworowy w USA (National Cancer Institute, Bethesda, USA); nor-MDP — nor-muramylo-dipeptyd (*N*-acetylo-nor-muramylo-L-alanylo-D-izoglutamina); MS — spektroskopia masowa; OAT — *O*-acetylotransferaza; Panc 03 — nowotwór trzustki 03; rewertant — mutant odzyskujący cechy szczepu poprzedniego; SMZ — sulfametiazyna; TLC — chromatografia cienkowarstwowa; topo II — topoisomeraza II; UDS — nieprawidłowa synteza DNA, synteza służąca naprawie uszkodzeń DNA dająca w efekcie błędny DNA prowadząc do śmierci komórki nowotworowej, nie jest związana z cyklem komórkowym (ang. *unscheduled DNA synthesis*); UDPGT — urydynodifosfoglukuronozylotransferaza (ang. *uridine diphospho-glucuronosyl transferase*); VM-26 — tenipozyd.

### I. Wstęp

Mimo wielu stosowanych chemioterapeutyków nadal brakuje skutecznych leków w walce z wyniszczającą, prowadzącą często do śmierci chorobą nowotworową. Większość stosowanych do tego celu leków wykazuje wysoką toksyczność przejawiającą się licznymi objawami niepożądanymi lub wywołuje reakcje nadwrażliwości. Poważną wadą stosowanych leków jest częste występowanie zjawiska oporności wielolekowej. Komórki nowotworowe mogą wykazywać nadprodukcję białka powodującego oporność na leki, co sprawia, iż transport hydrofobowych leków poza komórkę zachodzi z taką samą szybkością jak ich dyfuzja do wnętrza komórki. Wyróżnia się kilka nadrodzin białek transportujących przez błony, najliczniejszą z nich jest nadrodzina ABC, której nazwa pochodzi od angielskiej nazwy *ATP binding cassette* czyli kasetta wiążąca adenozy-5'-trifosforanu (ATP), są one ATPazami zawierającymi charakterystyczną domenę wiążącą ATP [1]. Białko odpowiedzialne za oporność na leki może transportować bardzo różnorodne hydrofobowe farmaceutyki, nabycie oporności na jeden z nich powoduje, że wiele innych jest również nieskutecznych. Nieznane są dotychczas leki, które działałyby selektywnie w oparciu o różnice w sekwencji nukleotydów spowodowane mutacjami. Poszukuje się więc ciągle nowych leków lub modyfikuje się już ist-

<sup>1</sup>Dr inż., <sup>2</sup>student, <sup>3</sup>prof. dr hab. inż.; Katedra Chemii Organicznej, Politechnika Gdańska, ul. G. Narutowicza 11/12, 80-952 Gdańsk, tel. (058) 347 27 36, e-mail: kd@chem.pg.gda.pl

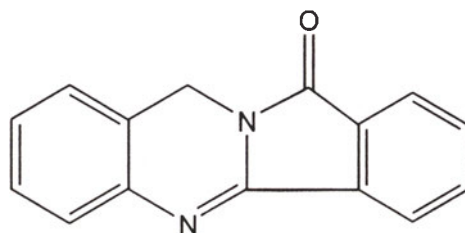
niejące. Za celowością tej drugiej drogi przemawiają wyniki osiągnięte w terapii chorób zakaźnych dzięki wprowadzaniu nowych pochodnych sulfonamidu czy penicylin. Chemiczna modyfikacja cząsteczki znanego leku może prowadzić do uzyskania preparatów o zupełnie nowych cechach, korzystnych z klinicznego punktu widzenia. Jako przykłady mogą służyć półsyntetyczne penicyliny, pochodne cefalosporyny C, czy rifamycyny.

W wielu laboratoriach, w różnych częściach świata prowadzi się badania mające na celu uzyskanie terapeutyków działających w sposób bezpieczny lub przynajmniej mało szkodliwy dla pacjenta. Jednym z takich potencjalnych leków poddawanych wszechstronnym badaniom jest batracylina (BAT), związek, który przeszedł pomyślnie testy *in vitro*, a obecnie jest intensywnie sprawdzany *in vivo*. Kontynuując w naszym laboratorium program otrzymywania koniugatów muramylo-dipeptydu (MDP) oraz nor-muramylo-dipeptydu (nor-MDP), znanych immunomodulatorów, ze związkami o aktywności przeciwnowotworowej [2-4] przeprowadziliśmy syntezę połączeń wiązaniem amidowym cząsteczki MDP oraz nor-MDP z batracyliną lub pochodnymi batracyliny. Naszym zdaniem taka modyfikacja nie tylko powinna zwiększyć rozpuszczalność batracyliny w wodzie, ale i korzystnie zmienić jej aktywność biologiczną.

## II. Batracylina — 8-aminoizoindolo[1,2-b]-chinazolino-12(10H)-on

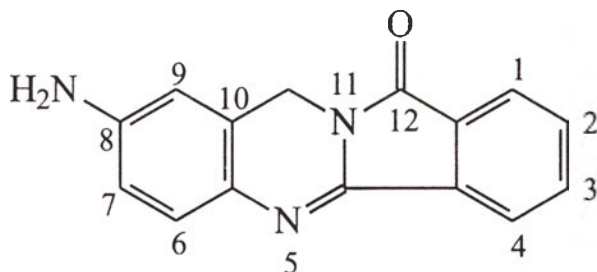
Związki zawierające skondensowane pierścienie tetracykliczne dihydrochinazoliny (Wzór I) zostały zsyntezowane już w 1912 roku przez S. G a b r i e l a [5], ale dopiero w 1978 roku M. J. K a b b e [6] otrzymał 8-amino-pochodną tego związku, która później nazwana została batracyliną (BAT) (Wzór II). Batracylina jest heterocykliczną, nierozpuszczalną w wodzie aminą, wyselekcjonowaną podczas realizacji Development Therapeutics Program of the National Cancer Institute (NCI, Bethesda, USA). Związek ten wykazuje silną aktywność przeciwnowotworową w licznych badaniach *in vitro* i *in vivo*. Batracylina jest aktywna przeciwnowotworowo *in vivo* przeciw mysiej białaczce P-388. Jest to obserwacja szczególnie godna uwagi ponieważ białaczkę P-388 charakteryzuje oporność na większość stosowanych leków takich, jak adriamycyna, cis-platyna i metotreksat [7,8]. BAT jest także aktywna we wczesnym i zaawansowanym stadium rozwoju nowotworu okrężnicy 38 (Colon 38) [7]. Okazało się, że doustne podawanie BAT skutecznie likwiduje także inne mysie lite nowotwory, np: raka trzustki (Panc

03), nowotwór okrężnicy (Colon 51) i dojrzały rak wątroby 129. BAT nie jest aktywna w przypadku czerniaka B16, raka CD8F1 sutka, białaczki L1210, nowotworu płuc Lewisa oraz ludzkiego raka MX-1 sutka. Podskórne podawanie BAT działa na nowotwór okrężnicy (Colon 9) i raka trzustki (Panc 03), ale nie wykazuje działania na raka sutka 16/C [7]. Wyniki przesiewowych badań *in vivo* przeprowadzonych na myszach otrzymano podczas podawania BAT doustnie lub wewnątrzotrzewnowo. Lepsze re-



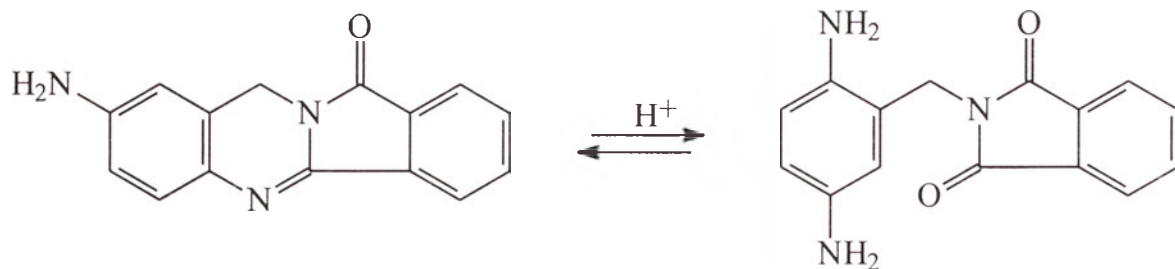
Wzór I. Izoindolo[1,2-b]-chinazolino-12(10H)-on

zultaty uzyskano przez podawanie wewnątrzotrzewnowe. Dawki BAT wydłużające czas przeżycia w trakcie leczenia mysich nowotworów są wysokie i wynoszą od 400-800 mg/kg. Po podaniu BAT obserwowano opóźnioną neurotoksyczność, wątrobową toksyczność i znaczną utratę wagi organizmu gospo-



Wzór II. Batracylina (BAT) — 8-aminoizoindolo[1,2-b]-chinazolino-12(10H)-on

darza. Objawy te jednak ustępowały po pewnym czasie. Mimo, iż BAT była nieaktywna *in vitro* na komórki nowotworowe pochodzenia ludzkiego (H-125, CX-1, HCT-8, HCT-116), a wykazywała jedynie cytotoksyczność na wyselekcjonowane mysie lite nowotwory, weszła w 1988 roku do toksykologicznych badań w National Cancer Institute (Bethesda, USA) na dużych zwierzętach [9]. W trakcie badań stwierdzono, że w środowisku kwaśnym następuje odwracalna hydroliza BAT, przy czym obserwowano otwieranie heterocyklicznego pierścienia (Schemat 1). Produkt otwarcia pierścienia nie został zidentyfikowany w osoczu krwi myszy po podaniu BAT, nie można jednak wykluczyć, że to on

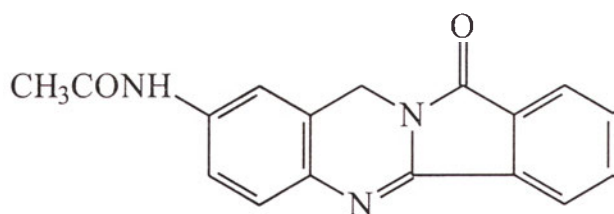


Schemat 1. Odwracalna hydroliza BAT w środowisku kwaśnym

przyczynia się do podwyższenia aktywności przeciwnowotworowej BAT szczególnie w tych przypadkach, w których preparat był podawany wewnątrztrzewnowo [10].

### III. Rola *N*-acetylowania w procesie metabolizmu batracyliny

Zaobserwowano duże różnice w działaniu BAT u myszy, szczurów i psów [11]. Jedna dziesiąta doustnej dawki LD<sub>10</sub> myszy (1855 mg/kg) była śmiertelna dla szczurów, podczas gdy psy były mniej wrażliwe na tę substancję niż myszy. Przy podawaniu szczurom 2.2 mg/kg dziennie przez 9 dni obserwowano nerkową, żołądkowo-jelitową i jądrową toksyczność. Tę dużą wrażliwość szczurów na BAT łączono z wysokim stężeniem *N*-acetylo-metabolitu BAT w osoczu. Przyczyną zaobserwowanej różnicy jest inna aktywność *N*-acetylotransferazy (NAT, czynnik ace-



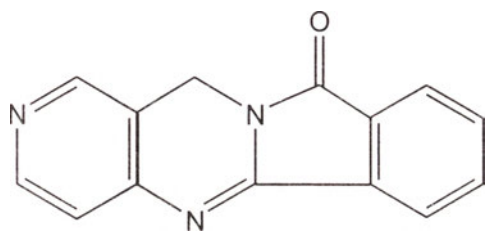
Wzór III. *N*-Acetylo-batracylina (ABAT)

tylujący) u myszy i szczurów. Podanie takiej samej dawki BAT wywołuje 9-krotnie większe stężenie *N*-acetylo-batracyliny (ABAT) (Wzór III) u szczurów niż u myszy. Niska wrażliwość psów na toksyczne działanie BAT wynika z tego, że u psów aktywność *N*-acetylotransferazy jest wyjątkowo niska. Tolerują one dwukrotnie wyższą, niż myszy, dawkę BAT [12-15]. Zróżnicowanie zdolności poszczególnych organizmów do acetylowania aminowych aromatycznych leków jest dobrze znana [16, 17]. Polimorfizm aktywności *N*-acetylotransferazy/*O*-acety-

lotransferazy (NAT/OAT) różnych organizmów, w tym ludzkiego był intensywnie badany. Zidentyfikowane zostały dwa enzymy NAT1 i NAT2, odpowiedzialne za *N*-acetylowanie i *O*-acetylowanie amin aromatycznych. Wykazano, że można wyróżnić organizmy szybko i powoli acetylujące substraty [17]. Rolę *N*-acetylowania w genotoksyczności czyli zdolności uszkodzenia komórkowego materiału genetycznego polegającego na kowalencyjnym łączeniu się z DNA, heterocyklicznej aminy, jaką jest BAT, badano z udziałem szczepów *Salmonella typhimurium* zmodyfikowanych tak, że następowało zahamowanie ich wzrostu w nieobecności histydyny. Zaobserwowano zależność pomiędzy aktywnością bakteryjnej *N*-acetylotransferazy a mutagennym działaniem BAT. Szczepy bakterii *Salmonella typhimurium* (YG 1012 i YG 1024) z większą zdolnością do *N*-acetylowania BAT okazały się bardziej wrażliwe na mutagenne działanie leku w porównaniu ze szczepami *Salmonella typhimurium* (TA 98/1.8-DNP<sub>6</sub> i TA 1538/1.8-DNP<sub>6</sub>), u których występuje brak zdolności do *N*-acetylowania BAT. Liczba rewertantów/nmol BAT i tworzenie *N*-acetylo-BAT były 50-krotnie większe u YG 1024 w porównaniu do TA 98. Podobną odpowiedź obserwowano w przypadku szczepów YG 1012 i TA 1538. Sprawdzano również własności mutagenne BAT w stosunku do cytosolowych hepatocytów komórek szczurów i myszy. Ilość powstającej *N*-acetylo-BAT (ABAT) była 6-krotnie większa w hepatocytach szczurzych (F-344) niż w hepatocytach mysich [18, 19]. W badaniach *in vivo* obserwowano zwiększone wydzielanie komórkowej dehydrogenazy mleczanowej EC 1.1.1.27 w hepatocytach komórek szczurzych osobników męskich w porównaniu z osobnikami żeńskimi w obecności deksametazonu, które malało po podaniu troleandomycyny. Wyniki te sugerują, że CYP3A pośredniczy w tworzeniu cytotoksycznego produktu. Natomiast nieobecność w środowisku czerwieni fenolowej, substratu UDPGT (UDP-glukuronozylotransferazy), powodowało redukcję własności cytotoksycznych BAT. Można wysunąć wniosek, że dużą rolę w

biotransformacji BAT odgrywa nie tylko NAT, ale również cytochrom P450 czy UDPGT. Produkty tych przemian mogą wpływać na cytotoksyczność i mutagenne działanie batracyliny [19].

W roku 1999 podjęto badania nad ludzkim metabolizmem batracyliny. Ludzka wątroba produkuje dwie różne *N*-acetylotransferazy (NAT1 i NAT2). NAT1 jest wolnym acetylatozem, podczas gdy NAT2 zalicza się do acetylatorów szybkich. Do badań, oprócz batracyliny, włączono sulfametiazynę (SMZ) — substrat NAT2, oraz kwas *p*-aminobenzoesowy



Wzór IV.

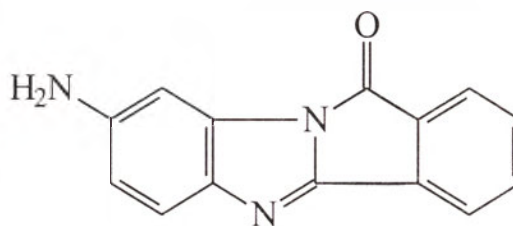
8-aza-BAT

(PABA) — substrat NAT1. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że BAT jest podobnie acetylowana jak sulfametiazyna, co sugeruje, że BAT jest substratem ludzkiej NAT2 [20]. Ten „szybki acetylator” z dużym prawdopodobieństwem może powodować większe niepożądane działanie toksyczne w organizmie po podaniu tego związku.

#### IV. Aktywność przeciwnowotworowa BAT i jej analogów

Nieoczekiwana toksyczność BAT dla szczurów spowodowała, że National Cancer Institute postanowił wstrzymać dalsze badania z udziałem BAT [12]. Ale nie można było przeczyć faktu, że BAT działa skutecznie w przypadkach nowotworu okrężnicy 38 (Colon 38), który jest nowotworem najczęściej występującym u ludzi, i jak do tej pory nie ma skutecznych leków jego zwalczania. Podczas ostatniej dekady wykryto tylko kilka związków wykazujących dużą aktywność przeciw temu nowotworowi, między innymi: analogów benzopiranyowych, np. flawonowych pochodnych kwasu octowego czy *cis*-platyny 233 [21]. Zachęciło to badaczy do syntezy analogów BAT w nadziei otrzymania związku o lepszych parametrach farmakologicznych, w leczeniu nowotworu okrężnicy. W różnych ośrodkach akademickich i firmach farmaceutycznych Europy i Stanów Zjednoczonych, zsyntetyzowano kilkadziesiąt analogów BAT w poszukiwaniu analogów rozpuszczalnych w wodzie, o przedłużonym czasie działania, obniżonej

toksyczności i podwyższonej aktywności. Badania nad zależnością aktywności biologicznej BAT od jej struktury chemicznej wykazały, że modyfikacje chemiczne cząsteczki, tak jej pierścienia dihydrochinazoliny, jak i grupy aminowej, a także wprowadzenie dodatkowych ugrupowań, znacznie wpływają na aktywność biologiczną i spektrum działania pochodnych BAT. Me e g a l l a i wsp. [22] zsyntezowali 8-deaminobatracylinę (Wzór I) i 8-aza-batracylinę, które wykazywały obniżoną toksyczność oraz związek i jego analogi, w których pierścień



izoindolo[2,1-a]-benzimidazolo-12(10H)-on

6-członowy został zastąpiony 5-członowym czyli benzimidazolowym (Wzór IV). Niektóre z tych analogów okazały się inhibitorami topoizomerazy II (topo II) i indukowały UDS w szczurzych hepatocytach. Zarówno 8-deamino-BAT, jak i 8-aza-BAT wykazują aktywność jako inhibitory topoizomerazy II, a w przeciwieństwie do BAT nie indukują syntezy DNA związanej z procesami naprawczymi czyli syntezy, która nie jest związana z cyklem komórkowym (UDS). Te analogi wykazują mniejszą cytotoksyczność niż BAT, wykazują także mniejszą ostrą toksyczność *in vivo*. L u o i wsp. [23] zsyntezowali serię analogów BAT, których własności badano w hamowaniu białaczki HL-60 i indukowaniu topoizomerazy II. Wszystkie związki z wolną grupą aminową wykazały aktywność w obu testach, co sugeruje, że metaboliczne reakcje substytucji mogą prowadzić do powstawania związków o pożądanej aktywności biologicznej. Dowodzi to faktu, że mechanizm aktywności przeciwnowotworowej batracyliny nie opiera się wyłącznie na oddziaływaniu z kompleksem DNA-topoizomeraza II.

W literaturze opisano kilka metod otrzymania BAT. Pierwsza metoda zaproponowana przez H. J. K a b b e [6] polega na kondensacji 2,5-diaminobenzylaminy z bezwodnikiem ftalowym. W 1990 roku [24] przedstawiono syntezę BAT opartą na wykorzystaniu 4-(acetyloamino)-fenylokarbaminianu etylu, który w reakcji ftalimidometylowania wg. Czerniaka-Einhorna i kwaśnej hydrolizy grup ochronnych: acetylowej i uretanowej, a następnie

zalkalizowaniu amoniakiem daje batracylinę. Trzecią z metod otrzymywania BAT jest redukcja 8-nitroizoindolo-[1,2-b]-chinazolino-12(10*H*)-onu w lodowatym kwasie octowym za pomocą wodoru w obecności katalizatora jakim jest pallad na węglu (Pd/C) [22].

Opatentowana w 1988 roku BAT [25] jest związkiem nierozpuszczalnym w wodzie i słabo rozpuszczalnym w roztworach słabych kwasów, co uniemożliwia jej doustne podawanie. W 1990 roku ukazał się patent [26] firmowany przez Bayera na pochodne BAT zawierające reszty aminokwasów i peptydów. Takie pochodne były rozpuszczalne w wodzie, bardzo stabilne w wodnym buforowym roztworze (pH 4-10), ale szybko ulegały degradacji do BAT w wyniku działania peptydaz — enzymów obecnych w ludzkim osoczu. W 1992 roku ukazał się kolejny patent [27] na pochodne BAT zawierające pierścień cukrowy fukozy. W 1996 i 1998 roku zsyntetyzowano całą serię związków, połączeń cytostatyków (daunorubicyna, metotreksat, etopozyd, taksol, daunomycyna, itd.) w tym batracyliny, z węglowodanami oraz z tiokarbonyłowymi aminokwasami [28, 29]. Analogi te wykazują dobrą rozpuszczalność w wodzie i wysoką aktywność cytostatyczną, często skierowaną wyłącznie na komórki nowotworowe.

## V. Podsumowanie

Batracylina (BAT) została wyselekcjonowana przez National Cancer Institute (NCI, Bethesda, USA) w 1978 roku jako efekt programu poszukiwań nowych leków chemioterapii. Związek ten w badaniach *in vivo* u myszy okazał się bardzo aktywny przeciw nowotworowi okrężnicy 38 (Colon 38), trudnemu do wyleczenia przez znane leki przeciwnowotworowe. Wprost niewiarygodne wydawały się rezultaty leczenia tym preparatem, ponieważ dwie zaledwie doustne dawki pozwoliły na całkowite wyleczenie testowanych myszy. Dlatego firma Bayer AG wystąpiła z wnioskiem o opatentowanie batracyliny już w roku 1988. Okazała się ona skuteczna również w leczeniu mysiej białaczki P-388, bardzo odpornej na stosowane antracyklinowe leki, takie jak dokсорubicyna, metotreksat czy cis-platyna. Mechanizm działania BAT nie jest jeszcze jasny. Wiadomo już, że jest ona inhibitorem topoizomery II i indukuje UDS, w nieproliferujących komórkach. Słaba rozpuszczalność BAT w wodzie, jej ogólna toksyczność, szczególnie u szczurów, przy konieczności stosowania wysokich dawek ogranicza jej przydatność jako chemioterapeutyka. Ważną rolę w toksyczności BAT odgrywa jej metabolizm. Za pomocą HPLC,

TLC i analizy MS zidentyfikowano *N*-acetylo-BAT jako główny metabolit. Później stwierdzono, że *N*-acetylacja jest pierwszym etapem metabolizmu BAT w organizmie. U szczurów obserwowano zarówno większą toksyczność BAT, jak i znacznie większe nagromadzenie w ich organizmach *N*-acetylo-BAT niż u myszy przy podawaniu doustnym takiej samej dawki BAT. Wydaje się prawdopodobne, że BAT może okazać się wysoce toksyczna także u ludzi, z tego powodu w NCI zaprzestano dalszych badań BAT, a podjęto prace syntetyczne prowadzące do otrzymania jej analogów o lepszych własnościach terapeutycznych. Wiele z nich jest chronione patentami. Ochrona patentowa, trwająca 20 lat, pozwala jednak na przeprowadzenie badań klinicznych, opracowanie formy leku i jego wprowadzenie na rynek.

## Podziękowania

Praca została sfinansowana przez Komitet Badań Naukowych. Grant Nr 4 P05F 017 16.

Artykuł otrzymano 20 sierpnia 2001  
Zaakceptowano do druku 5 stycznia 2002

## Piśmiennictwo

1. Matthews H R, Freedland R A, Miesfeld R L (2000) W: J Fronka (red) *Biochemia i biologia molekularna w zarysie*, Prószyński i S-ka, Warszawa, str. 65
2. Dzierzbicka K, Kołodziejczyk A M, Wysocka-Skrzeła B, Kołodziejczyk A S (1994) *Polish J Chem*, **68**: 37-45
3. Dzierzbicka K, Gozdowska M, Wysocka-Skrzeła B, Kołodziejczyk A M (1999) *Acta Poloniae Pharmaceutica* **56**: 20-24
4. Sosnowska D, Myśliwski A, Dzierzbicka K, Kołodziejczyk A M (1997) *Biotherapy* **10**: 161-168
5. Gabriel S (1912) *Berichte deut. chem. Gesell.* **45**: 713-725
6. Kabbe H J (1978) *Liebigs Ann. Chem.* 398-404
7. Plowman J, Paul K D, Atasii G, Harrison S D, Dykes D J, Kabbe H J, Narayanan V L, Yoder O C (1988) *Invest. New Drugs* **6**: 147-153
8. Waud W R, Harrison S D, Gilbert K S, Laster W R, Griswold D P (1991) *Cancer Chemother. Pharmacol.* **27**: 456-463
9. Mucci-LoRusso P, Polin L, Bissery M C, Valerriote F, Plowman J, Luk G D, Corbett T H (1989) *Invest. New Drugs* **7**(4): 295-306
10. Ames M M, Mathiesen D A (1989) *J. Chromatogr.* **491**: 488-494
11. El-Hawari M, Stoltz M L, Pallas F (1989) *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.* **30**: 626
12. Ames M M, Mathiesen D A, Reid J M (1991) *Invest. New Drugs* **9**: 219-225
13. Lower G M, Bryan G T (1973) *Biochem. Pharmacol.* **22**: 1581-1588
14. Stevens G J, Meegalla S K, Makhey D, LaVoie E J, McQueen Ch A (1993) *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.* **34**: 158
15. Stevens G J, McQueen Ch A (1994) *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **126**: 39-44

16. Hein D W, Rustan T D, Ferguson R J, Doll M A, Gray K (1994) *Arch. Toxicol.* **68**: 129-133
17. Weber W W (1987) Oxford University Press, New York
18. Stevens G J, LaVoie E J, McQueen Ch A (1996) *Carcinogenesis* **17**:115-119
19. Stevens G J, Burkey J L, McQueen C A (2000) *Cell Biology & Toxicology* **16**(1): 31-39
20. Stevens G J, Payton M, Sim E, McQueen C A (1999) *Drug Metabolism & Disposition* **27**(9): 966-971
21. Atassi G, Dumont P, Kabbe H J, Yoder O (1988) *Drugs Exptl. Clin. Res.* **XIV** (9): 571-574
22. Meegalla S K, Stevens G J, McQueen Ch A, Chen A Y, Chiang Y, Liu L F, Barrows L R, LaVoie E J (1994) *J. Med. Chem.* **37**: 3434-3439
23. Luo Y, Ren Y F, Chou T Ch, Chen A Y, Yu Ch, Liu L F, Cheng C C (1993) *Pharmaceutical Research* **10**(6): 918-923
24. Roservear J, Wilshire F K (1990) *Aust. J. Chem.* **43**: 339-353
25. Kabbe H J, Bierling R, Atassi G (1988) United States Patent 4.757.072
26. Stella V, Al-Razzak L A, Kabbe H J (1990) United States Patent 4.980.343
27. Lerchen H G, Piel N, Lorentzen J P, Antonicek H P, Kabbe H J (1992) European Patent Office 0 501 250 A1
28. Lerchen H G, Von Dem Bruch K, Petersen U, Baum-Gartem J, Piel N, Antonicek H P, Weichel W, Sperzel M, Bremm K (1996) PCT/EP96/01279
29. Patent WO (1998) 98/15571

# Mechanizm aktywacji czynnika transkrypcyjnego NF $\kappa$ B przez czynnik martwicy nowotworu (TNF)

## Mechanism of NF $\kappa$ B activation by tumor necrosis factor (TNF)

MAŁGORZATA M. DOSZCZAK<sup>1</sup>, LUCYNA KASZUBOWSKA<sup>2</sup>,  
ARKADIUSZ PIERZCHALSKI<sup>3</sup>, JACEK BIGDA<sup>4</sup>

### Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Receptory TNF i kompleks receptorowy
- III. Główne szlaki sygnalizacji TNF
- IV. Czynniki transkrypcyjne NF $\kappa$ B
  - IV-1. Rodzina NF $\kappa$ B
  - IV-2. Rodzina I $\kappa$ B
- V. Aktywacja czynnika transkrypcyjnego NF $\kappa$ B przez TNF
- VI. Znaczenie NF $\kappa$ B w terapii nowotworów, chorób wirusowych i stanów zapalnych

### Contents:

- I. Introduction
- II. TNF receptors and receptor complex
- III. Major pathways of TNF signal transduction
- IV. Transcription factor NF $\kappa$ B
  - IV-1. The NF $\kappa$ B family
  - IV-2. The I $\kappa$ B family
- V. NF $\kappa$ B activation by TNF
- VI. Role of NF $\kappa$ B in tumor, viral infection and inflammatory disease therapy

**Wykaz stosowanych skrótów:** ABIN — inhibitor aktywacji NF $\kappa$ B wiążący A20 (ang. *A20-binding inhibitor of NF $\kappa$ B activation*), AP-1 — czynnik transkrypcyjny-1 (ang. *activator protein-1*), ARD — domena powtórzeń ankirynowych (ang. *ankyrin repeat domain*), CAPK — kinaza aktywowana ceramidem (ang. *ceramide-activated protein kinase*), CAPP — fosfataza aktywowana ceramidem (ang. *Ceramide-activated protein phosphatase*), c-IAP — komórkowe białko hamujące apoptozę (ang. *cellular inhibitor of apoptosis protein*), DAG — diacyloglicerol, DD — domena śmierci (ang. *death domain*), ERK — kinaza regulowana czynnikami pozakomórkowymi (ang. *extracellular signal-regulated kinase*), FADD/MORT — białko posiadające domenę śmierci związane z receptorem Fas/mediator śmierci indukowanej przez receptor (ang. *Fas-associating protein with death domain /mediator of receptor-induced toxicity*), FAN — czynnik związany z aktywacją obojętnej SMazy (ang. *factor associated with neutral SMase activation*), ICAM — cząsteczka adhezji międzykomórkowej (ang. *intercellular adhesion molecule*), IKAP — białko zasocjowane z kompleksem IKK (ang. *IKK complex-associated protein*), I $\kappa$ B — inhibitor  $\kappa$ B, IKK — kinaza I $\kappa$ B, IL — interleukina, LPS — lipopolisacharyd, MADD — białko aktywujące MAPK posiadające do-

menę śmierci (ang. *MAPK-activating death domain protein*), MAPK — kinaza białka aktywowanego przez mitogeny (ang. *Mitogen-activated protein kinase*), MAPKAPK-2 — kinaza białka zasocjowanego z MAPK 2 (ang. *MAPK-associated protein kinase-2*), MAP2K — kinaza kinazy MAP, MEKK — kinaza kinazy MAPK/ERK (ang. *MAPK/ERK kinase kinase*), NAK/TBK1 — kinaza aktywująca NF $\kappa$ B/kinaza wiążąca TRAF (ang. *NF $\kappa$ B-activating kinase/TRAF-binding kinase*), NEMO/IKK $\gamma$ /IKKAP1/FIP3 — podstawowy regulator NF $\kappa$ B/kinaza I $\kappa$ B  $\gamma$ /białko zasocjowane z kompleksem IKK/białko reagujące z białkiem 14,7K (ang. *NF $\kappa$ B essential regulator/I $\kappa$ B kinase  $\gamma$ /IKK-associated protein 1/14.7K-interacting protein*), NF $\kappa$ B — czynnik jądrowy  $\kappa$ B (ang. *nuclear factor  $\kappa$ B*), NIK — kinaza indukująca NF $\kappa$ B (ang. *NF $\kappa$ B-inducing kinase*), NLS — sekwencja translokacyjna do jądra komórkowego (ang. *nuclear localization signal*), PC-PLC — fosfatydylocholino-specyficzna fosfolipaza C, PEST — sekwencja bogata w reszty proliny, kwasu glutaminowego, seryny i treoniny, PI-3K — 3-kinaza fosfatydyloinozytolu, PKB/Akt — kinaza białkowa B, PKC — kinaza białkowa C, PKR — kinaza białkowa aktywowana przez dwuniciowe RNA, PMA — octan mirystynianu forbolu (ang. *phorbol myristate acetate*), RAIDD/CRADD — białko związane z RIP homologiczne do Ich-1/CED3 posiadające domenę śmierci/adaptor kaspaz i RIP posiadający domenę śmierci (ang. *RIP-associated Ich-1/CED3 homologous protein with death domain/caspase and RIP adaptor with death domain*), Rel — onkogen indyczego wirusa wywołującego siatkowico-śródłonkowicę (*reticuloendotheliosis*), RHD — sekwencja homologii do białka Rel (ang. *Rel homology domain*), RIP — białko oddziałujące z receptorem (ang. *receptor-interacting*

<sup>1</sup>Mgr, <sup>2</sup>dr, <sup>3</sup>mgr, <sup>4</sup>dr hab.; Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii UG-AMG, Katedra Histologii i Immunologii, Akademia Medyczna w Gdańsku, ul. Dębinki 1, 80-211 Gdańsk, tel. 058/ 349-14-34, fax 058/349-14-45, e-mail: jj-



protein), SAPK/JNK — kinaza aktywowana przez czynniki stresowe / kinaza końca aminowego białka c-Jun (ang. *Stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase*), SCD — domena klastra serynowego (ang. *serine cluster domain*), SMaza — sfingomielinaza, TACE — enzym konwertujący TNF $\alpha$  (ang. *TNF-alpha-converting enzyme*), TANK/I-TRAF — aktywator NF $\kappa$ B związany z czynnikiem z rodziny TRAF/inhibitor białek TRAF (ang. *TRAF family member-associated NF $\kappa$ B activator/inhibitor of TRAF*), TNF — czynnik martwicy nowotworu (ang. *tumor necrosis factor*), TNFR — receptor dla TNF (ang. *TNF receptor*), TRADD — białko, posiadające domenę śmierci, oddziałujące z receptorem TNF (ang. *TNF receptor-associated protein with a death domain*), TRAF — czynnik związany z TNFR (ang. *TNF receptor-associated factor*), TTRAP — białko związane z TRAF i receptorem TNF (ang. *TRAF and TNF receptor-associated protein*), Ub — ubikwityna.

## I. Wstęp

Czynnik martwicy nowotworu (TNF) jest cytokiną regulującą reakcję zapalną i odpornościową. Poprzez wpływ na liczne procesy metaboliczne, TNF jest zdolny do regulacji różnorodnych funkcji komórek m. in. wydzielania substancji immunomodulujących, proliferacji i różnicowania. Wydzielanie lokalne TNF modyfikuje przebieg procesu zapalnego toczącego się w narządach. Przejawami systemowego działania TNF w reakcji odpornościowej są m. in. indukcja gorączki, utrata apetytu, wzrost poziomu białek ostrej fazy w osoczu.

TNF jest produkowany przez makrofagi, a także inne komórki prawidłowe i nowotworowe aktywowane przez czynniki infekcyjne (np. lipopolisacharyd bakteryjny, wirusy) oraz cytokiny prozapalne [1]. TNF wykazuje aktywność biologiczną zarówno w formie błonowej, jak i rozpuszczalnej, którą stanowi trimer złożony z identycznych cząsteczek TNF. Forma rozpuszczalna powstaje wskutek działania metaloproteinazy TACE (ang. *TNF-alpha-converting enzyme*) na formę błonową TNF i uwolnienia jej części odpowiadającej segmentowi zewnątrzkomórkowemu [1, 2].

Cechą charakterystyczną TNF jest plejotropowy charakter jego działania. Plejotropia TNF wynika ze zdolności receptorów TNF do uruchamiania wielu ścieżek sygnalizacji wewnątrzkomórkowej, a w konsekwencji aktywacji różnorodnych czynników transkrypcyjnych wpływających na ekspresję wielu genów. Plejotropię działania TNF potęguje obecność receptorów TNF prawdopodobnie na wszystkich jądrzastych komórkach, które wskutek swojego zróżnicowania w odmienny sposób mogą reagować na obecność tej cytokiny.

Efekty działania TNF są niekiedy przeciwstawne. Na przykład TNF indukuje śmierć komórek, ale

zdolny jest również do pobudzenia ich proliferacji i wywołania oporności na apoptozę. TNF hamuje krwiotworzenie, ale także wzmacnia ekspresję hemopoetycznych czynników wzrostu. TNF pobudza reakcję zapalną, ale w jej późniejszych etapach ją wyhamowuje [3]. Wydaje się zatem, że przeciwstawne niekiedy działania cytokiny, indukującej uszkodzenia komórek i tkanek, a jednocześnie pobudzającej mechanizmy naprawcze, ostatecznie pozwalają na przezwyciężenie urazu wywołanego pojawieniem się czynnika indukującego stan zapalny.

Nieprawidłowe wydzielanie TNF przyczynia się do rozwoju wielu chorób takich jak m. in. wstrząs septyczny, postać mózgowia malarii, choroba przeszczep przeciwko gospodarzowi (GVHD), stwardnienie rozsiane, cukrzyca, reumatoidalne zapalenie stawów, niedokrwistość, zapalenie mięśnia sercowego [1]. U chorych na nowotwory, zarówno niedobór, jak i nadprodukcja TNF mogą przyczyniać się do powstawania nieprawidłowej odpowiedzi immunologicznej ustroju i do przyspieszenia tworzenia przerzutów [4]. Nadmierne przewlekłe wydzielanie TNF może prowadzić do zmian metabolizmu organizmu, a w konsekwencji do jego wyniszczenia — kacheksji nowotworowej [10-12]. TNF może również wpływać hamująco na wzrost nowotworów poprzez bezpośrednie działanie cytotoksyczne oraz aktywację komórek układu odpornościowego [5-9].

## II. Receptory TNF i kompleks receptorowy

W warunkach niskiego pH czynnik martwicy nowotworu może wpływać na funkcję komórki bez pośrednictwa specyficznych receptorów. W obrębie trimery TNF dochodzi bowiem do zmian konformacyjnych polegających na odsłonięciu hydrofobowych reszt aminokwasowych (przede wszystkim tryptofanu), co pozwala na wbudowanie trimery w błonę komórkową w postaci kanału jonowego [13]. W warunkach fizjologicznych TNF oddziałuje na komórki za pośrednictwem specyficznych receptorów dwóch typów obecnych niemal na wszystkich komórkach jądrzastych ssaków [14, 15]: TNFR1 o masie 55 kDa [16, 17] i TNFR2 o masie 75 kDa [18, 19]. O ich wspólnym pochodzeniu świadczy podobieństwo sekwencji aminokwasowej segmentów zewnątrzkomórkowych receptorów, identycznej w 28%. Segmenty pozakomórkowe receptorów TNF są zbudowane z 4 domen bogatych w cysteinę [20], zaangażowanych w wiązanie liganda. Podobnie, jak w przypadku liganda, również receptory TNF funkcjonują w postaci trimerów złożonych z identycznych cząsteczek receptora TNFR1 lub TNFR2. Ważną

cechą segmentów pozakomórkowych receptora TNFR1 jest ich zdolność do samo-asocjacji, czyli zjawiska wiązania cząsteczek receptorów niezależnego od obecności TNF. Samo-asocjacja segmentów zewnątrzkomórkowych TNFR1 uniemożliwia samo-asocjację tzw. domen śmierci (DD, ang. *death domains*), znajdujących się w części wewnątrzkomórkowej receptora TNFR1. Asocjacja domen śmierci prowadzi do uruchomienia kaskady sygnalizacyjnej apoptozy. Dlatego samo-asocjacja segmentów zewnątrzkomórkowych TNFR1 chroni komórkę przed spontaniczną, niezależną od liganda, indukcją sygnału prowadzącego do śmierci apoptotycznej [21].

W obrębie segmentu pozakomórkowego, w rejonie łączącym domeny bogate w cysteinę z fragmentem transbłonowym, znajdują się miejsca rozpoznawane przez proteazę TACE, zdolną do odcinania części cząsteczki TNF, stanowiącej rozpuszczalną formę receptora [21].

Ponieważ większa część sygnałów docierających do receptorów TNF ulega transdukcji za pośrednictwem receptora TNFR1, a duża część efektów biologicznych wynikających z pobudzenia TNFR2 pokrywa się z funkcjami receptora TNFR1, samodzielna rola receptora TNFR2 w transdukcji sygnału stała się kwestią dyskusyjną. W 1993 roku Tartaglia i Goeddel zaproponowali hipotezę "przekazywania liganda" (ang. *ligand passing*), wyjaśniającą mechanizm współdziałania dwóch receptorów TNF. Według tej hipotezy TNFR2 jest zdolny do uruchomienia sygnalizacji wewnątrzkomórkowej tylko pewnych, specyficznych dla tego receptora funkcji. Natomiast aktywności uruchamiane zarówno przez TNFR2, jak i TNFR1 są efektem zewnątrzkomórkowego współdziałania receptorów. Receptor TNFR2 wykazujący wysokie powinowactwo do TNF jest bowiem zdolny do wychwytywania liganda (szczególnie w niskich dawkach cytokiny) i przekazywania go (ang. *ligand passing*) na powierzchni komórki receptorowi TNFR1 [22]. Stwierdzono, że TNFR1 przekazuje sygnał indukowany przez rozpuszczalną formę TNF, podczas gdy TNFR2 stanowi receptor specyficzny dla formy błonowej TNF [23]. Dalsze badania wykazały możliwość kooperacji obu receptorów nie tylko na poziomie zewnątrzkomórkowym (przekazywanie liganda), ale i wewnątrzkomórkowym — dzięki białkom adaptorowym.

Związanie trimerycznego liganda przez część zewnątrzkomórkową receptora TNF powoduje asocjację domen wewnątrzkomórkowych niezbędną do rozpoczęcia transdukcji sygnału [24]. Inicjacja sygnalizacji receptorów dla TNF wiąże się z etapem

aktywacji enzymów efektorowych za pośrednictwem tzw. białek adaptorowych wiążących się z domeną wewnątrzkomórkową receptora. Białka adaptorowe najczęściej nie wykazują aktywności enzymatycznej, mają natomiast zdolność do asocjacji między sobą tworząc kompleks cząsteczek uczestniczących w sygnalizacji różnych efektów w zależności od enzymu, z którym się zwiążą. Białka adaptorowe wiążące się z receptorami TNF należą do dwóch rodzin białek adaptorowych: 1. białek zawierających tzw. domenę śmierci (DD, ang. *death domain*): TRADD (ang. *TNF receptor-associated death domain protein*) [25], RIP (ang. *receptor-interacting protein*) [26], FADD/MORT1 (ang. *Fas-associated death domain protein / mediator of receptor-induced toxicity*) [27, 28], RAIDD/CRADD (ang. *RIP-associated Ich-1/CED3 homologous protein with death domain / caspase and RIP adaptor with death domain*) [29, 30], MADD (ang. *MAP-kinase activating death domain protein*) [31]; 2. białek zawierających domenę TRAF (ang. *TNF receptor-associated factors*) [32]. Domena śmierci została wykryta w 1993 roku jako 80-aminokwasowy odcinek obecny w części cytoplazmatycznej receptora TNFR1 i Fas [33, 34], zaangażowany w transdukcję sygnału prowadzącego do śmierci komórki [35]. Domena DD stanowi z jednej strony sekwencję adaptorową dla białek asocjujących, a z drugiej jest przekaźnikiem zmian konformacyjnych. Domeny DD białek adaptorowych mogą ze sobą asocjować, co sprzyja inicjacji i amplifikacji sygnału. Asocjacja domen DD opiera się prawdopodobnie na wzajemnych oddziaływaniach elektrostatycznych, ponieważ rejon ten tworzą ułożone przeciwrównolegle amfipatyczne  $\alpha$ -helisy bogate w reszty aminokwasowe o charakterze zarówno kwaśnym (kwas asparaginowy, glutamina), jak i zasadowym (arginina i lizyna) [36]. Białka należące do rodziny TRAF wykazują obecność na końcu karboksylowym homologicznej domeny TRAF, dzięki której są w stanie asocjować zarówno z receptorami rodziny TNFR, jak i pomiędzy sobą [32]. Są one zaangażowane w transdukcję sygnału zarówno TNFR1, jak i TNFR2 [32, 37-41]. Poza białkami należącymi do dwóch opisanych grup zidentyfikowano jeszcze jedno białko adaptorowe, nazwane FAN. Nie posiada ono domen DD i TRAF i przyłącza się do receptora TNFR1 powyżej domeny śmierci [42].

Pierwszym białkiem adaptorowym przyłączającym się do receptora TNFR1 po związaniu TNF jest TRADD, które wiąże się za pośrednictwem swojej domeny DD do domeny śmierci receptora stanowiąc platformę adaptorową dla innych białek biorących udział w sygnalizacji TNF: FADD, RIP i TRAF2 [25,

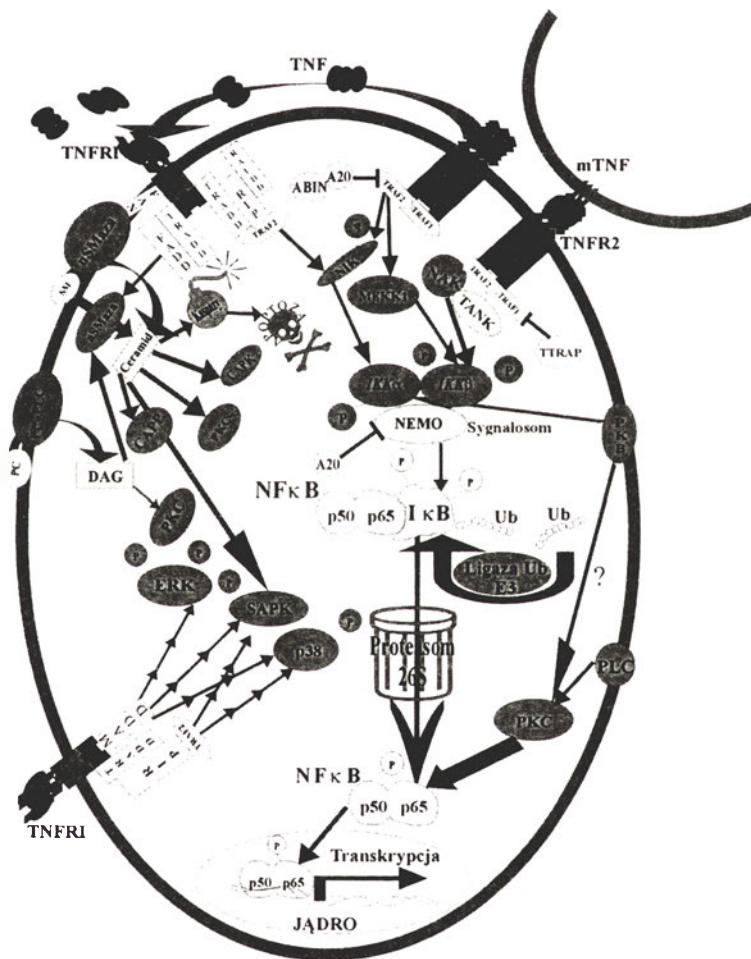
37-39, 41]. Natomiast z receptorem TNFR2 asocjuje bezpośrednio białko TRAF2, a pośrednio TRAF1 tworzące heterodimer z białkiem TRAF2 [32, 37]. Białka TRAF mogą także asocjować z cząsteczkami zaangażowanymi w sygnalizację receptora TNFR1, TRADD i RIP [38, 39]. W ten sposób wiązanie TNF do jego receptorów powoduje utworzenie złożonego kompleksu receptorowego, co umożliwia inicjację wielu szlaków transdukcji sygnału.

### III. Główne szlaki sygnalizacji TNF

Najważniejsze szlaki sygnalizacji wewnątrzkomórkowej (Ryc. 1) uruchamiane przez receptory

wskutek wiązania TNF prowadzą do apoptozy oraz aktywacji czynników transkrypcyjnych, które regulują ekspresję genów kodujących białka zaangażowane w przebieg reakcji zapalnej oraz w ochronę komórki przed śmiercią. Są to przede wszystkim czynniki NFκB oraz AP-1. Szlaki sygnalizacji wewnątrzkomórkowej uruchamiane przez TNF rozpoczynają się od interakcji pomiędzy receptorami a białkami adaptorowymi. Kolejnym etapem jest przekazanie sygnału od białek adaptorowych do białek efektorowych.

Indukcja apoptozy następuje po stymulacji receptora TNFR1, z którym asocjują kolejno przy udziale domen śmierci białka TRADD i FADD [28, 39].



**Ryc. 1.** Szlaki sygnalizacji inicjowane przez pobudzenie receptorów TNF prowadzące do aktywacji czynnika transkrypcyjnego NFκB. Zastosowane oznaczenia i skróty: → — aktywacja, —|— — inhibicja, prostokąty białe — białka adaptorowe posiadające domenę śmierci, sześciokąty — białka adaptorowe należące do rodziny TRAF, elipsy ciemne — białka o aktywności enzymatycznej, elipsy jasne — białka regulatorowe, elipsy białe — substraty enzymów, prostokąty jasne — wtórne przekazniki, ośmiokąty — inhibitory. Stosowane skróty: ABIN — inhibitor aktywacji NFκB wiążący A20, aSMaza — sfingomielinaza kwaśna, CAPK — kinaza aktywowana ceramidem, CAPP — fosfataza aktywowana ceramidem, DAG — diacyloglicerol, ERK — kinaza regulowana czynnikami pozakomórkowymi, FADD — białko posiadające domenę śmierci związane z receptorem Fas, FAN — czynnik związany z aktywacją obojętnej SMazy, IκB — inhibitor κB, IKK — kinaza IκB, MADD — białko aktywujące MAPK posiadające domenę śmierci, MEKK1 — kinaza kinazy MAPK/ERK 1, mTNF — błonowa forma TNF, NAK — kinaza aktywująca NFκB, NEMO — podstawowy regulator NFκB/kinaza IκB γ, NFκB — czynnik jądrowy κB, NIK — kinaza indukująca NFκB, nSMaza — sfingomielinaza obojętna, P — grupa fosforanowa, p38 — kinaza białka aktywowanego przez mitogeny o masie cząsteczkowej 38 kDa, PC — fosfatydylocholina, PC-PLC — fosfatydylocholino-specyficzna fosfolipaza C, PKB — kinaza białkowa B, PKC — kinaza białkowa C, PLC — fosfolipaza C, RAIDD — białko związane z RIP homologiczne do Ich-1/CED3 posiadające domenę śmierci, RIP — białko oddziałujące z receptorem, SAPK — kinaza aktywowana przez czynniki stresowe / kinaza końca aminowego białka c-Jun, SM — sfingomielina, TANK — aktywator NFκB związany z czynnikiem z rodziny TRAF, TNF — czynnik martwicy nowotworu, TNFR — receptor dla TNF, TRADD — białko, posiadające domenę śmierci, oddziałujące z receptorem TNF, TRAF — czynnik związany z TNFR, TTRAP — białko związane z TRAF i receptorem TNF, Ub — ubiquityna.

Drogą alternatywną jest asocjacja z TNFR1 białka TRADD, a następnie RIP i RAIDD [26, 30]. W dalszą sygnalizację procesu zaangażowana jest kaskada enzymów z rodziny proteaz cysteinowych zwanych kaspazami (ang. *caspases* — *cysteiny-l-aspartate-specific-proteinases*) [43], przeprowadzających cięcie proteolityczne substratów za resztą kwasu asparaginowego. Prekursory kaspaz wiążą się z białkami regulatorowymi powyżej własnego miejsca aktywnego za pośrednictwem sekwencji DED (ang. *death effector domain*) lub CARD (ang. *caspase recruitment domain*), wykazujących podobieństwo strukturalne do domen DD [44-46].

Poza szlakiem aktywacji kaspaz aktywowane są inne szlaki sygnalizacji wewnątrzkomórkowej. Już w kilka minut po związaniu liganda z receptorem TNFR1 fosfatydylocholino-specyficzna fosfolipaza C (PC-PLC) katalizuje hydrolizę fosfatydylocholinu do diacyloglicerolu, który jest aktywatorem kinazy białkowej C i kwaśnej sfingomielinazy (aSMaza). Zlokalizowana w lizosomach kwaśna sfingomielinaza podobnie jak znajdująca się w błonie komórkowej obojętna sfingomielinaza (nSMaza) hydrolizuje sfingomielinę do ceramidów, wtórnych przekaźników wielu odpowiedzi komórkowych [47]. Aktywacja obu rodzajów sfingomielinaz zachodzi z udziałem różnych białek adaptorowych. W proces aktywacji nSMazy zaangażowane jest białko adaptorowe FAN, które wiąże się z sekwencją zlokalizowanej powyżej domeny DD receptora TNFR1, określaną jako domena aktywująca obojętną sfingomielinazę (ang. *NSD* — *neutral sphingomyelinase-activating domain*) [42, 48]. W aktywację kwaśnej sfingomielinazy zaangażowana jest domena DD receptora oraz białka adaptorowe TRADD i FADD [49, 50]. Ceramidy z kolei aktywują swoistą grupę kinaz CAPK (ang. *ceramide-activated protein kinase*) i fosfataz białkowych CAPP (ang. *ceramide-activated protein phosphatases*) [51]. Innymi białkami, które przypuszczalnie mogą być aktywowane przez ceramidy są: kinaza białkowa C  $\zeta$ , JNK i kaspazy [50].

TNF może wpływać na aktywację kaskady kinaz MAP, również inne szlaki sygnalizacji inicjowane pobudzeniem receptorów TNF mogą regulować tę kaskadę sygnalizacyjną. Kaskady MAP składają się z 3 elementów: serynowo-treoninowej kinazy MAP (MAPK, ang. *mitogen-activated protein kinase*), kinazy fosforylującej kinazę MAP (MAP2K) i serynowo-treoninowej kinazy fosforylującej MAP2K (MAP3K). Obecnie znane są u ssaków 3 kaskady kinaz MAP pełniące inne funkcje, ale krzyżujące się na różnych poziomach, aktywowane przez receptory TNF: SAPK/JNK, p38 MAPK i ERK. SAPK/JNK to

kaskada kinaz aktywowana przez czynniki stresowe (ang. *stress-activated protein kinase* / *c-Jun N-terminal kinase*), uczestnicząca w regulacji ekspresji genów poprzez aktywację czynników transkrypcyjnych takich jak: AP-1 (poprzez aktywację białka c-Jun), ATF2, Elk-1, CREB [3]. Aktywacja tej kaskady przez TNF odbywa się za pośrednictwem białek adaptorowych TRAF2 i RIP [52, 53]. Istnieją także przesłanki o zaangażowaniu w sygnalizację tego szlaku niedawno zidentyfikowanego białka adaptorowego MADD wiążącego się z domeną DD receptora TNFR1 [31] i ceramidu powstającego po aktywacji kwaśnej sfingomielinazy [54]. Kaskada p38 MAPK uczestniczy w regulacji szeregu genów związanych z reakcją zapalną poprzez aktywację czynników transkrypcyjnych (ATF2) i enzymów cytosolowych (fosfolipaza A2, MAPKAPK2). Podobnie jak w przypadku SAPK1/JNK, aktywacja p38 MAPK odbywa się za pośrednictwem białek adaptorowych RIP i TRAF2 [3]. Kaskada ERK (ang. *extracellular signal-regulated kinase*) jest zaangażowana w procesy różnicowania i reakcji zapalnej. Substratami są czynniki transkrypcyjne (Elk-1) i enzymy cytosolowe (fosfolipaza A2). Podobnie jak w przypadku kinaz SAPK1/JNK, w aktywację ERK/MAP jest zaangażowane białko MADD wchodzące w skład kompleksu sygnalizacyjnego TNFR1 [31].

#### IV. Czynniki transkrypcyjne NF $\kappa$ B

Czynnik transkrypcyjny NF $\kappa$ B jest wspólnym elementem licznych szlaków sygnalizacji wewnątrzkomórkowej. Do jego aktywacji dochodzi w wyniku bezpośredniego oddziaływania patogenów bakteryjnych z receptorami komórkowymi lub po stymulacji przez cytokiny. Aktywacja NF $\kappa$ B jest jednym z najistotniejszych procesów indukowanych przez TNF. Prowadzi bowiem do aktywacji transkrypcji ponad 100 genów, które zaangażowane są w proces reakcji zapalnej, proliferacji, różnicowania oraz ochrony komórki przed apoptozą. Ich produkty to m. in. cząsteczki adhezyjne ICAM, chemokiny (np. IL-8), cyklooksygenaza II, indukowalna syntaza tlenu azotu, białka ochronne (A20, manganowa dysmutaza ponadtlenkowa).

Cechą charakterystyczną białek NF $\kappa$ B jest występowanie ich nieaktywnej formy cytoplazmatycznej w postaci kompleksu z białkami inhibitorowymi z rodziny I $\kappa$ B. Białka I $\kappa$ B maskują sekwencję translokacyjną do jądra komórkowego (NLS, ang. *nuclear localization signal*) uniemożliwiając tym samym translokację NF $\kappa$ B do jądra komórkowego. Stymulacja receptorów komórkowych przez czynniki takie,

jak TNF, IL-1 lub LPS prowadzi do uwolnienia NFκB przez IκB, co umożliwia translokację czynnika do jądra komórkowego. Dzięki temu, że aktywacja czynników transkrypcyjnych NFκB nie wymaga syntezy białka, możliwa jest szybka i efektywna aktywacja genów docelowych.

#### IV-1. Rodzina NFκB

Czynnik transkrypcyjny NFκB został pierwotnie zidentyfikowany jako białko wykazujące powinowactwo do sekwencji GGGACTTCC obecnej w rejonie enhancerowym genu kodującego lekki łańcuch immunoglobulinowy (Ig) w limfocytach B [55]. Sekwencje κB wykryto następnie w rejonach regulacyjnych wielu innych genów związanych z reakcją zapalną (IL-6, TNF, limfotoksyna), apoptozą (Myc, p53, Rb1), adhezją komórek (ELAM1, VCAM1, ICAM1), różnicowaniem (IL-2, IFN-α, IFN-β) [56]. NFκB występuje w postaci dimeru, w skład którego u ssaków mogą wchodzić podjednostki: p65/RelA, p50, p52, c-Rel, RelB. Cechą wspólną białek NFκB jest znajdująca się na końcu aminowym 300-aminokwasowa domena RHD (ang. *Rel homology domain*). W obrębie domeny RHD znajduje się miejsce wiążące z DNA, sekwencje odpowiedzialne za dimeryzację, jądrowa sekwencja translokacyjna (NLS) i miejsce wiążące dla inhibitora IκB [57].

Zdolność białek NFκB do regulacji transkrypcji wynika z obecności w ich końcu karboksylowym tzw. domeny transaktywującej. Taką domenę zawierają: p65/RelA, c-Rel i RelB [58]. Podjednostki p50 i p52 w przeciwieństwie do pozostałych białek NFκB nie zawierają domeny transaktywującej i jako homodimery nie są w stanie uczestniczyć w regulacji transkrypcji. Dimery o różnym składzie mogą zatem działać jako aktywatory lub represory transkrypcji genów z motywem κB. Co więcej, różne dimery NFκB mogą preferencyjnie rozpoznawać określone sekwencje κB. Transaktywacja genu przez NFκB może być także wzmacniana lub blokowana przez inne czynniki wiążące się z DNA w pozycji *cis* względem miejsc κB [58].

#### IV-2. Rodzina IκB

U ssaków zidentyfikowano 6 rodzajów inhibitorów NFκB: IκBα, IκBβ, IκBε, IκBγ, IκBδ oraz Bcl-3 [57]. Strukturalną cechą charakterystyczną dla białek IκB jest domena powtórzeń ankirynowych (ARD, ang. *ankyrin repeat domain*), składająca się z 6-7 sąsiadujących ze sobą powtórzeń o długości 30-33 aminokwasów. Domena ARD odpowiada za

interakcję z cząsteczką NFκB. Jak wykazała analiza krystalograficzna struktury kompleksu NFκB/IκB [59], tworzy ona cylinder z pięcioma pętlami wysuniętymi poza rdzeń złożony z upakowanych w formie stosu α-helis. Pętle pomiędzy powtórzeniami zawierają reszty aminokwasowe odpowiedzialne za specyficzne wiązanie dimerów NFκB. Inhibitorowe działanie IκB związane jest ze zmianą konformacji podjednostki p65 po związaniu inhibitora, co doprowadza do zasłonięcia kluczowych dla wiązania z DNA reszt aminokwasowych [57].

Domena SRD (ang. *signal receiving domain*) składająca się z reszt aminokwasowych zaangażowanych w procesie fosforylacji i ubikwitynacji cząsteczki inhibitora znajduje się N-terminalnie względem domeny ARD. Bogata w reszty aminokwasowe proliny, kwasu glutaminowego, seryny i treoniny sekwencja PEST występuje C-terminalnie względem domeny ARD. Za główną funkcję sekwencji PEST przez długi czas uważano jej udział w regulacji okresu półtrwania białka, taką rolę wykazano bowiem dla podobnych sekwencji w przypadku innych białek [60]. Jak wykazała jednak analiza biochemiczna C-terminalny fragment tej sekwencji razem z domeną ARD uczestniczy także w stabilizacji kompleksu NFκB/IκB [61].

Dalsze badania nad szlakiem sygnalizacyjnym NFκB wykazały, że syntetyzowany w cytoplazmie IκB może przemieszczać się do jądra komórkowego, gdzie asocjując z podjednostkami p50 i p65/RelA NFκB może usuwać czynnik transkrypcyjny z sekwencji promotorowych doprowadzając do zakończenia transkrypcji [62, 63]. W rezultacie cały kompleks NFκB/IκB przemieszcza się z powrotem do cytoplazmy [64]. Cząsteczka IκB jest zatem w stanie kontrolować aktywność NFκB na zasadzie sprzężenia zwrotnego prowadząc z jednej strony do aktywacji, a z drugiej do hamowania transkrypcji genów kontrolowanych przez ten czynnik transkrypcyjny [59].

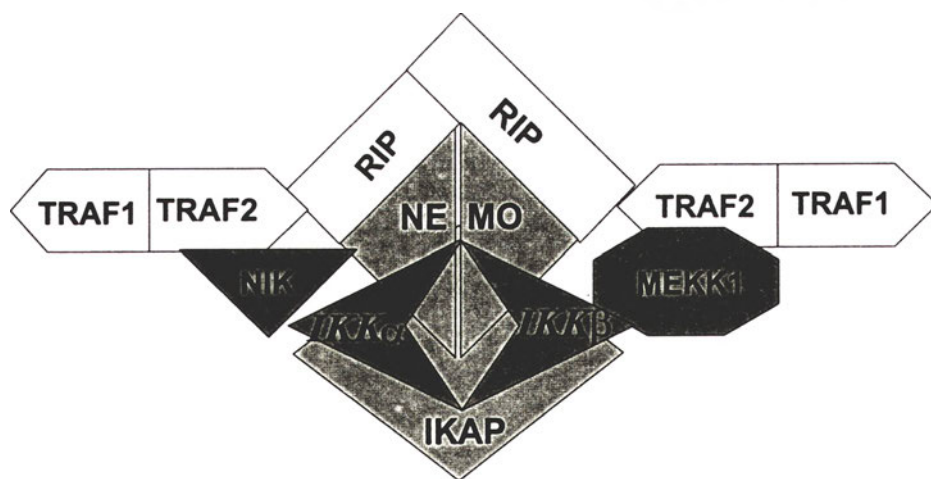
#### V. Aktywacja czynnika transkrypcyjnego NFκB przez TNF

Czynnik transkrypcyjny NFκB jest aktywowany w odpowiedzi na stymulację komórki przez TNF dzięki transdukcji sygnału wiodącego kilkoma kooperującymi ze sobą szlakami. Na podstawie zgromadzonej wiedzy można założyć, że do efektywnej aktywacji NFκB niezbędne są co najmniej dwa zdarzenia: degradacja IκB umożliwiająca translokację czynnika do jądra i wiązanie do DNA oraz uzyskanie aktywności transaktywacyjnej co najmniej jednej

podjednostki dimeru (najczęściej p65/RelA) dzięki jej fosforylacji.

Szlak prowadzący do degradacji IκB został dosyć dobrze poznany. Może on być inicjowany przez pobudzenie receptorów TNF obu typów. Rozpoczyna się od opisanych wcześniej interakcji pomiędzy białkami kompleksu receptorowego. Związanie liganda z receptorem TNFR2 prowadzi do bezpośredniej asocjacji białka adaptorowego TRAF2, najczęściej występującego w formie heterodimeru z białkiem TRAF1 [37]. Z kolei stymulacja receptora TNFR1 indukuje oddziaływanie z białkiem TRADD, a za jego pośrednictwem z RIP. Białko RIP następnie asocjuje z TRAF2 [38-40]. Wydawało się więc, że adaptor TRAF2 stanowi element węzłowy, zaangażowany w sygnalizację obu receptorów TNF i skupiający sygnał aktywujący NFκB. Wniosku tego nie potwierdziły jednak wyniki badań z myszami nie posiadającymi genów kodujących białka RIP i TRAF2. Okazało się bowiem, że brak białka RIP skutkuje defektem aktywacji NFκB, natomiast brak białka TRAF2 tylko nieznacznie osłabia aktywację NFκB [65, 66]. TRAF2 nie wydaje się więc niezbędny dla mobilizacji tego czynnika transkrypcyjnego. TRAF2 oddziałuje z pierwszym elementem szlaku sygnalizacji całkowicie specyficznym dla NFκB: kinazą NIK (ang. *NFκB-inducing kinase*) [53, 67]. Do aktywacji NIK dochodzi prawdopodobnie w wyniku wstępnej fosforylacji w rejonie N-terminalnym kinazy, która doprowadza do jej częściowej aktywacji i

nieaktywną kinazą NIK wskazują jednak, że jej obecność nie jest niezbędna dla aktywacji NFκB przez TNF [69, 70]. Substratem kinazy NIK są kinazy inhibitora κB, określane jako IKKα (ang. *IκB kinase α*), zidentyfikowana pierwotnie jako kinaza CHUK o nieznanym wtedy funkcji [71-73] oraz IKKβ (ang. *IκB kinase β*) [74, 75]. NIK preferencyjnie fosforyluje Ser<sup>176</sup> w cząsteczce IKKα, może również fosforylować IKKβ [76]. Kinaza IKKβ wydaje się być bardziej istotna dla aktywacji NFκB w odpowiedzi na TNF i inne cytokiny prozapalne, podczas gdy IKKα steruje transkrypcją zależnych od NFκB genów w czasie rozwoju embrionalnego — wykazały to badania na komórkach myszy o fenotypie IKKα<sup>-/-</sup> i IKKβ<sup>-/-</sup> [77-79]. Obie homologiczne kinazy IKK zawierają charakterystyczny dla MAP2K motyw pętli aktywacyjnej (SxxxS). Mogą tworzyć zarówno homo-, jak i heterodimery z tym, że aktywność wobec IκB wykazują tylko heterodimery. W proces tworzenia heterodimerów zaangażowany jest motyw zamka leucynowego obecny w obu kinazach, natomiast motyw helisa-pętla-helisa bierze prawdopodobnie udział we wzajemnych oddziaływaniach z innymi białkami w ramach makromolekularnego kompleksu o masie cząsteczkowej ok. 800 kDa, zwanego sygnałosomem (ang. *signalosome*) (Ryc. 2) [73, 75, 80]. W skład tego kompleksu, poza IKKα i β oraz NIK, wchodzi również białko NEMO/IKKγ/IKKAP1/FIP-3 (ang. *NFκB essential modulator/IκB kinase γ/IKK-associated protein 1/14.7K-interacting*



Ryc. 2. Schemat kompleksu sygnałosomu. Zastosowane skróty: IKAP — białko zasocjowane z kompleksem IKK, IKK — kinaza IκB, MEKK1 — kinaza kinazy MAPK/ERK 1, NEMO — podstawowy regulator NFκB/kinaza IκB γ, NIK — kinaza indukująca NFκB, RIP — białko oddziałujące z receptorem, TRAF — czynnik związany z TNFR.

umożliwia autofosforylację kluczowych reszt aminokwasowych. Kinaza NIK jest wspólnym mediatorem sygnalizacji receptorów szeregu cytokin, oprócz TNF-R1 także IL-1RI, Fas, CD30, CD40, IL-17R zachodzącej z udziałem białek z grupy TRAF [53, 67, 68]. Wyniki badań przeprowadzonych na myszach z

*protein 3*). Delecje zarówno w części N-, jak i C-terminalnej tego białka blokują aktywację czynnika NFκB pod wpływem TNF i innych stymulatorów (IL-1, LPS, PMA) [81-84]. NEMO zawiera m. in. zamek leucynowy, za pomocą którego prawdopodobnie łączy aktywatory z kompleksem IKK. Domeny

C-terminalne dimeru NEMO oddziałują z domeną wewnętrzną (ang. *intermediate domain*) dimeru RIP. Wymuszona przez RIP dimeryzacja NEMO wywołuje z kolei oddziaływanie domen N-terminalnych NEMO z C-terminalnymi domenami SCD (ang. *serine cluster domain*) IKK $\alpha$  i IKK $\beta$ , których N-terminalne domeny kinazowe oddziałując za sobą tworzą dimer. Prowadzi to do oligomeryzacji całego kompleksu IKK, fosforylacji Ser<sup>177</sup> i Ser<sup>181</sup> w pętli T IKK $\beta$ , skutkiem czego jest aktywacja IKK [78, 85, 86]. Dane te są sprzeczne z wynikami opisanymi w jednej z pierwszych prac identyfikujących NEMO, nazywane przez autorów FIP-3 [83]. W pracy tej FIP-3 opisany jest jako inhibitor aktywacji NF $\kappa$ B, który hamuje aktywację poprzez wiązanie się z cząsteczkami RIP i NIK. Sugeruje się, że poza regulacją i koordynacją aktywności IKK, NEMO jest białkiem strukturalnym (ang. *scaffold protein*).

W składzie sygnałsomu zidentyfikowano ponadto inne białko strukturalne, nazwane IKAP (ang. *IKK-complex-associated protein*) [87]. Wydaje się jednak, że w przeciwieństwie do NEMO obecność IKAP nie jest konieczna dla prawidłowego działania kompleksu. IKAP może występować w kompleksie z innymi białkami, regulować inne czynniki transkrypcyjne, a jego zablokowanie przy pomocy oligonukleotydów antysensownych nie ma wpływu na aktywację NF $\kappa$ B [88].

Niedawno odkryto kolejną kinazę serynowo-treoninową IKK-i zdolną do fosforylacji I $\kappa$ B $\alpha$ . Nie jest ona jednak aktywowana przez znane stymulatory NF $\kappa$ B, co rodzi wątpliwości co do jej fizjologicznego znaczenia dla aktywacji tego czynnika transkrypcyjnego [89]. Homologiczna z IKK kinaza NAK/TBK1 (ang. *NF $\kappa$ B-activating kinase/TRAF-binding kinase*), która tworzy kompleks z TANK/I-TRAF oraz TRAF2, może być mediatorem aktywacji NF $\kappa$ B przez TRAF2, 5, 6 oraz TANK/I-TRAF. Wydaje się ona działać powyżej kompleksu IKK, przyczyniając się do aktywacji IKK $\beta$  i uruchamiając mechanizm dodatniego sprzężenia zwrotnego powodującego wzmocnienie tej aktywacji. Nie jest jednak niezbędna dla aktywacji NF $\kappa$ B przez TNF, IL-1 i CD40, w związku z czym wydaje się być elementem innego szlaku sygnalizacji [90, 91].

Do zaktywowanego kompleksu kinaz I $\kappa$ B przyłącza się następnie inhibitor I $\kappa$ B $\alpha$ , który ulega fosforylacji w miejscu Ser<sup>32</sup> i Ser<sup>36</sup> katalizowanej przez heterodimer IKK $\alpha$ /IKK $\beta$ . Fosforylacja inhibitora prowadzi następnie do jego ubikwitynacji przez ligazę ubikwityny E3 i degradacji z udziałem proteasomu 26S. Uwolniony czynnik transkrypcyjny NF $\kappa$ B przemieszcza się do jądra komórkowego,

gdzie wiąże się do sekwencji promotorowych kontrolowanych przez siebie genów [92].

W ostatnim czasie wykazano, że w proces aktywacji NF $\kappa$ B indukowanej przez TNF zaangażowana jest 3-kinaza fosfatidyloinozytolu (PI-3K, ang. *phosphatidylinositol 3-kinase*). Produkty lipidowe powstające na skutek jej działania z lipidowych substratów błonowych działają jako wtórne przekaźniki, które aktywują kinazę serynowo-treoninową PKB/Akt. Kinaza ta fosforyluje IKK- $\alpha$  w pozycji Thr<sup>32</sup>. Mutacja punktowa w obrębie tej reszty aminokwasowej hamuje zarówno proces fosforylacji przez kinazę PKB/Akt, jak i proces aktywacji NF $\kappa$ B. Doświadczenia z zastosowaniem zmutowanych cząsteczek kinaz PKB/Akt i NIK wykazały, że obie kinazy są niezbędne do efektywnej aktywacji czynnika transkrypcyjnego w komórkach HeLa i Me180 [93]. Z kolei wyniki innych doświadczeń, przeprowadzonych na komórkach śródbłonna z użyciem inhibitorów PI-3K, poddają w wątpliwość udział kinazy PKB/Akt aktywowanej przez TNF w procesie mobilizacji czynnika transkrypcyjnego NF $\kappa$ B [94].

Postuluje się również możliwość aktywacji NF $\kappa$ B za pośrednictwem kinaz z grupy MAPK. Najczęściej podkreślany jest udział MEKK1 (ang. *MAPK/ERK kinase kinase 1*) [95-97]. MEKK1 została wykryta w aktywnym kompleksie sygnałsomu. Stwierdzono, że preferencyjnie stymuluje aktywność kinazy IKK $\beta$  [97, 98], w wyniku czego fosforylacji i degradacji ulega I $\kappa$ B $\alpha$  [95, 96]. Szlak MEKK1 jest komplementarny wobec opisanego powyżej szlaku NIK. Mediatorem aktywacji MEKK1 wydaje się być TRAF2. W procesie tym kluczowa jest domena efektorowa TRAF2 zawierająca palce cynkowe i RING [99]. Wyniki przeprowadzonych ostatnio eksperymentów z makrofagami i fibroblastami myszy z nieaktywnym genem MEKK1 negują jednak kluczowe znaczenie tej kinazy w szlaku NF $\kappa$ B [100]. Oprócz MEKK1 o udział w procesie aktywacji kinaz IKK $\alpha$  i  $\beta$  (w wyniku czego dochodzi do fosforylacji I $\kappa$ B $\alpha$ ) podejrzewane są również MEKK2 i MEKK3 [101]. Niektórzy autorzy sugerują ponadto zaangażowanie kaskad MAPK p38 i ERK w indukcji aktywności transaktywacyjnej składnika p65 [102, 103].

Pojawiają się również liczne doniesienia o innych szlakach aktywacji NF $\kappa$ B, m. in. ścieżce niezależnej od TRADD i TRAF2, a zależnej od IRAK (ang. *interleukin 1 receptor-associated kinase*), kinazy kluczowej w głównym szlaku aktywacji NF $\kappa$ B przez receptor IL-1. W przeciwieństwie do sygnalizacji IL-1, w szlaku zależnym od TNF-R1 niezbędna jest aktywność enzymatyczna tej kinazy [104]. Postuluje się również udział kinazy białkowej C $\lambda$ / $\tau$  w aktywacji

NFκB [105]. Ponieważ jest ona uruchamiana przez mediatory lipidowe, m. in. produkty działania PI-3K, wydaje się, że może stanowić element szlaku PI-3K-PKB/Akt. W odpowiedzi na TNF kinaza białkowa C może być także aktywowana przez fosfolipazę C zależną od fosfatydylocholino. Aktywność PKC prowadzi do wzrostu aktywności transaktywacyjnej NFκB, ale nie ma wpływu na degradację IκBα, translokację jądrową NFκB i jego wiązanie do DNA [106]. Również kinaza PKR (kinaza białkowa aktywowana przez dwuniciowe RNA) może być zaangażowana w aktywację NFκB najprawdopodobniej wskutek interakcji z IKKβ [107].

Wspomniany wzrost aktywności transaktywacyjnej NFκB w odpowiedzi na pobudzenie receptorów TNF polega na fosforylacji specyficznych reszt seryny w domenie transaktywacyjnej; dotychczas zidentyfikowano fosforylację Ser<sup>529</sup> p65/RelA i Ser<sup>471</sup> c-Rel [108, 109].

Regulacja poszczególnych etapów mobilizacji NFκB jest skomplikowana, a dane o tych procesach tylko fragmentaryczne. Wśród genów odpowiedzi wczesnej, których transkrypcję aktywuje NFκB w odpowiedzi na TNF, są m. in. geny kodujące białka protekcyjne, chroniące komórki przed apoptozą, np. A20. Białko A20 wydaje się być ważnym negatywnym regulatorem aktywności NFκB w odpowiedzi na TNF [110]. Regulacja ta zachodzi prawdopodobnie dzięki bezpośredniej interakcji pomiędzy N-terminalną domeną A20 a TRAF2 [111] oraz pomiędzy C-terminalną domeną A20 a białkiem ABIN (ang. *A20-binding inhibitor of NF-κB activation*). Białko A20 pełni wówczas prawdopodobnie rolę białka adaptorowego łączącego TRAF2 z białkiem ABIN, które negatywnie reguluje działanie domeny transaktywacyjnej NFκB [112]. A20 nie ma natomiast wpływu ani na translokację czynnika NFκB do jądra, ani na jego wiązanie do DNA. Wydaje się, że inhibitorowe działanie układu A20-ABIN interferuje nie ze szlakiem aktywacji NFκB zależnym od NIK i IKK, lecz z innym szlakiem zależnym od RIP i TRAF2, prowadzącym do wzrostu aktywności transaktywacyjnej NFκB [112]. Jednakże niedawna praca Zhang i współpracowników sugeruje, że białko A20 może także regulować szlak prowadzący do aktywacji NFκB za pośrednictwem kompleksu IKK: A20 może bowiem regulować poziom NEMO, który z kolei wpływa na aktywację czynnika transkrypcyjnego [113].

Pod kontrolą NFκB znajdują się również geny TRAF1 i TRAF2 [114]. Aktywność NFκB po indukcji przez TNF może być regulowana przez TRAF1, przy czym sugerowany jest zarówno negatywny, jak i

pozytywny wpływ tego białka na aktywność NFκB [115, 116]. Niedawno zidentyfikowano nieznane dotąd białko TTRAP (ang. *TRAF and TNF receptor-associated protein*), które może wpływać hamująco na mobilizację czynnika transkrypcyjnego NFκB przez TNFR2. Regulacja ta zachodzi prawdopodobnie poprzez interakcję TTRAP z białkami adaptorowymi typu TRAF [117].

## VI. Znaczenie NFκB w terapii nowotworów, chorób wirusowych i stanów zapalnych

W związku z rolą, jaką NFκB odgrywa w regulacji apoptozy oraz procesów zapalnych istotne stało się zbadanie jego znaczenia w patogenezie chorób, w które zaangażowane są te procesy. Pozwoliłoby to na podjęcie prób specyficznego hamowania lub aktywowania tego czynnika w trakcie terapii. Okazało się, że zmiany w regulacji aktywności NFκB mogą mieć udział w patogenezie schorzeń takich jak: astma, reumatoidalne zapalenie stawów, choroba Crohna, wrzodziejące zapalenie okrężnicy, miażdżyca, choroba Alzheimera, liczne nowotwory [118]. Do tej pory istnieją rozbieżności dotyczące roli NFκB w indukcji procesu apoptozy. W przypadku chorób neurodegeneracyjnych, np. choroby Alzheimera stwierdzono fakt nasilenia procesów degeneracyjnych związany ze spadkiem aktywności NFκB, co wskazywałoby na protekcyjną rolę tego czynnika. Z drugiej strony zaobserwowano efekt ochronny salicylanów w tej chorobie, które działają z kolei jako inhibitory procesu aktywacji NFκB, co wskazywałoby na proapoptotyczną rolę tego czynnika. Nie ma jeszcze także dowodów stwierdzających jednoznacznie czy jest to czynnik działający protekcyjnie, czy proapoptotycznie podczas procesu onkogenezy. Istnieją natomiast dowody świadczące o zaangażowaniu NFκB w kontroli cyklu komórkowego, co może mieć znaczenie w regulacji proliferacji komórki nowotworowej [56].

Zarówno badania prowadzone na modelach komórkowych *in vitro* [119, 120], jak i *in vivo* na myszach z nieczynnym genem podjednostki p65/RelA [121] wykazały zaangażowanie NFκB w ochronę komórki przed apoptozą indukowaną przez różne czynniki, w tym TNF, co może wskazywać na wspólny element wielu szlaków sygnalizacji wykorzystywany przez komórkę do indukcji mechanizmów ochronnych [56].

Wykazano, że pod kontrolą NFκB znajdują się geny kodujące inhibitory apoptozy: c-IAP1 i c-IAP2, a zależny od NFκB proces hamowania apoptozy indukowanej przez TNF odbywa się na poziomie akty-



wacji kaspazy-8 [114]. Inne białka protekcyjne, których ekspresja jest zależna od NFκB to wspomniane już białko A20 oraz manganowa dysmutaza ponadtlenkowa [122, 123]. Wobec złożoności aparatu ochronnego komórki obserwuje się obecność zarówno NFκB-zależnych, jak i NFκB-niezależnych mechanizmów chroniących komórkę przed apoptozą [124].

Pomimo nie do końca poznanej funkcji regulacyjnej NFκB w procesie apoptozy, jest on niewątpliwie zaangażowany w uruchamianie mechanizmów ochronnych komórki, co jest elementem zupełnie niepożądanym w terapii nowotworów. Jest to o tyle istotne, że sama chemioterapia czy radioterapia wywołuje aktywację NFκB, a więc może indukować oporność komórek nowotworowych. Wspomaganie terapii podawaniem IκBα nieulegającego fosforylacji i degradacji (mutacje kluczowych reszt Ser<sup>32</sup> i Ser<sup>36</sup>) zwiększało skuteczność chemioterapii i apoptozy pod wpływem TNF w przypadku nowotworu krtani u myszy SCID [125]. Innym inhibitorem NFκB, który próbowano zastosować w terapii nowotworów mysich były antysensowne oligonukleotydy skierowane przeciwko podjednostce p65 NFκB. Ich zastosowanie wyraźnie obniżało zdolności komórek nowotworowych do przylegania, proliferacji i tworzenia przerzutów [126]. Do zahamowania ścieżki NFκB próbowano także wykorzystać inhibitory proteasomów. Limfocyty chorych na przewlekłą białaczkę leukocytarną traktowane inhibitorem proteasomu MG132 lub laktacystyną ulegały apoptozie [127]. W innych badaniach nowotworów myszy inhibitory proteasomów okazały się także skutecznymi lekami przeciwnowotworowymi w przypadku raka okrężnicy i chłoniaka Burkitta. Na przykład u myszy-nosicieli chłoniaka Burkitta, którym podano mały hydrofobowy peptyd Z-LLF-CHO stwierdzono znamienne statystycznie regresję guza i opóźnienie w jego wzroście sięgające 42% [128].

Czynnik NFκB jako mediator odpowiedzi zapalnej można także traktować jako potencjalny cel w terapii np. reumatoidalnego zapalenia stawów i chorób jelit o podłożu zapalnym. Niedawno wykryto, że powszechnie stosowane leki przeciwzapalne, takie jak aspiryna czy salicylan sodowy hamują aktywność IKKβ zaburzając w ten sposób aktywację NFκB [129]. Podobne działanie wykazuje inny niesterydowy lek przeciwzapalny sulfasalazyna, hamująca fosforylację IκBα po stymulacji TNF [130]. Hamowanie aktywności IKKβ zaobserwowano również w wyniku działania prostaglandyny A1. Jej powstanie jest katalizowane przez cyklooksygenazę 2, której ekspresję reguluje NFκB; w tym przypadku mamy

więc do czynienia z negatywnym sprzężeniem zwrotnym [131].

Część wirusów zawiera w sekwencjach promotorych niektórych genów miejsca wiązania NFκB. Zależny od aktywacji NFκB proces ekspresji tych genów prowadzi do namnażania wirusa, co potwierdziły badania prowadzone na zmutowanych sekwencjach κB. Podjęto więc próby konstrukcji antysensownych względem sekwencji κB oligonukleotydów, które mogłyby być wykorzystywane w terapii skierowanej przeciwko HIV-1, herpeswirusom, wirusowi grypy [132].

Z terapeutycznego punktu widzenia istotne wydaje się potrzebne jeszcze lepsze zrozumienie procesu regulacji szlaku NFκB, które umożliwi wprowadzenie nowych leków hamujących aktywację tego szlaku. Obecne próby modulacji farmakologicznej napotykać na trudności związane z niewystarczającą specyficznością stosowanych inhibitorów NFκB. Należy jednak pamiętać, że istotnym ograniczeniem dla stosowania leków blokujących aktywację NFκB pozostanie ryzyko obniżenia odporności wrodzonej, a w konsekwencji większa podatność na infekcje [118].

## Podziękowania

Praca wykonana w ramach projektów KBN: 4 P05A 029 12 i KBN 6 P04A 023 16.

Arkadiusz Pierchalski jest słuchaczem Studium Medycyny Molekularnej.

*Artykuł otrzymano 19 kwietnia 2001*

*Zaakceptowano do druku 7 stycznia 2002*

## Piśmiennictwo

1. Aggarwal B B, Natarajan K (1996) *Eur Cytokine Netw* 7: 93-124
2. Black R A, Rauch C T, Kozlosky C J, Peschon J J, Slack J L, Wolfson M F, Castner B J, Stocking K L, Reddy P, Srinivasan S, Nelson N, Boiani N, Schooley K A, Gerhart M, Davis R, Fitzner J N, Johnson R S, Paxton R J, March C J, Cerretti D P (1997) *Nature* 385: 729-733
3. Wallach D, Varfolomeev E E, Malinin N L, Goltsev Y V, Kovalenko A V, Boldin M P (1999) *Annu Rev Immunol* 17: 331-367
4. Orosz P, Echtenacher B, Falk W, Ruschoff J, Weber D, Mannel D N (1993) *J Exp Med* 177: 1391-1398
5. Haranaka K, Satomi N, Sakurai A (1984) *Int J Cancer* 34: 263-266
6. North R J, Havelle E A (1988) *J Exp Med* 167: 1086-1099
7. Renard N, Lienard D, Lespagnard L, Eggermont A, Heimann R, Lejeune F (1994) *Int J Cancer* 57: 656-663
8. Shimomura K, Manda T, Mukumoto S, Kobayashi K, Nakano K, Mori J (1988) *Int J Cancer* 41: 243-247
9. Fiers W (1991) *FEBS Lett* 285: 199-212

10. Moldawer L L, Gelin J, Schersten T, Lundholm K G (1987) *Am J Physiol* **253**: R922-R928
11. Tracey K J, Morgello S, Koplin B, Fahey T J, Fox J, Aledo A, Manogue K R, Cerami A (1990) *J Clin Invest* **86**: 2014-2024
12. Gelin J, Moldawer L L, Loenroth C, Sherry B, Chizonite R, Lundholm K (1991) *Cancer Res* **51**: 415-421
13. Kagan B L, Baldwin R L, Munoz D, Wisnieski B J (1992) *Science* **255**: 1427-1430
14. Hohmann H P, Remy R, Brockhaus M, van Loon A P (1989) *J Biol Chem* **264**: 14927-14934
15. Brockhaus M, Schoenfeld H J, Schlaeger E J, Hunziker W, Lesslauer W, Loetscher H (1990) *Proc Natl Acad Sci USA* **87**: 3127-3131
16. Loetscher H, Pan Y-C E, Lahm H-W, Gentz R, Brockhaus M, Tabuchi H, Lesslauer W (1990) *Cell* **61**: 351-359
17. Schall T J, Lewis M, Koller K J, Lee A, Rice G C, Wong G H W, Gatanaga T, Granger G A, Lentz R, Raab H, Kohr W J, Goeddel D V (1990) *Cell* **61**: 361-370
18. Smith C A, Davis T, Anderson D, Solam L, Beckmann M P, Dower S K, Cosman D, Goodwin R G (1990) *Science* **248**: 1019-1023
19. Dembic Z, Loetscher H, Gubler U, Pan Y-C E, Lahm H-W, Gentz R, Brockhaus M, Lesslauer W (1990) *Cytokine* **2**: 231-237
20. Tartaglia L A, Goeddel D V (1992) *Immunology Today* **13**: 151-153
21. Naismith J H, Devine T Q, Brandhuber B J, Sprang S R (1995) *J Biol Chem* **270**: 13303-13307
22. Tartaglia L A, Pennica D, Goeddel D V (1993) *J Biol Chem* **268**: 18542-18548
23. Grell M, Duoni E, Wajant H, Löhden M, Clauss M, Baxeiner B, Georgopoulos S (1995) *Cell* **83**: 793-802
24. Boldin M P, Mett I L, Varfolomeev E E, Chumakov I, Shemer A Y, Camonis J H, Wallach D (1995) *J Biol Chem* **270**: 387-391
25. Hsu H, Xiong J, Goeddel D V (1995) *Cell* **81**: 495-504
26. Stanger B Z, Leder P, Lee T-H, Kim E, Seed B (1995) *Cell* **81**: 513-523
27. Boldin M P, Varfolomeev E E, Pancer Z, Mett I L, Camonis J H, Wallach D (1995) *J Biol Chem* **270**: 7795-7798
28. Chinnaiyan A M, O'Rourke K, Tewari M, Dixit V M (1995) *Cell* **81**: 505-512
29. Duan H, Dixit V M (1997) *Nature* **385**: 86-89
30. Ahmad M, Srinivasula S M, Wang L, Talanian R V, Litwack G, Fernandez-Alnemri T, Alnemri E S (1997) *Cancer Res* **57**: 615-619
31. Schievella A R, Chen J H, Graham J R, Lin L L (1997) *J Biol Chem* **272**: 12069-12075
32. Rothe M, Wong S C, Henzel W J, Goeddel D V (1994) *Cell* **78**: 681-692
33. Itoh N, Nagata S (1993) *J Biol Chem* **268**: 10932-10937
34. Tartaglia L A, Ayres T M, Wong G H, Goeddel D V (1993) *Cell* **74**: 845-853
35. Nagata S (1997) *Cell* **88**: 355-365
36. Huang B, Eberstadt M, Olejniczak E T, Meadows R P, Fesik S W (1996) *Nature* **384**: 638-641
37. Rothe M, Sarma V, Dixit V M, Goeddel D V (1995) *Science* **269**: 1424-1427
38. Takeuchi M, Rothe M, Goeddel D V (1996) *J Biol Chem* **271**: 19935-19942
39. Hsu H, Shu H-B, Pan M-G, Goeddel D V (1996) *Cell* **84**: 299-308
40. Hsu H, Huang J, Shu H-B, Baichwal V, Goeddel D V (1996) *Immunity* **4**: 387-396
41. Varfolomeev E E, Boldin M P, Goncharov T M, Wallach D (1996) *J Exp Med* **183**: 1271-1275
42. Adam-Klages S, Adam D, Weigmann K, Struve S, Kolanus W, Schneider-Mergener J, Kronke M (1996) *Cell* **86**: 937-947
43. Nicholson D W, Thornberry N A (1997) *TIBS* **22**: 299-306
44. Hofmann K, Bucher P, Tschopp J (1997) *TIBS* **22**: 155-156
45. Eberstadt M., Huang B, Chen Z, Meadows R P, Ng S C, Zheng L, Lenardo M J, Fesik S W (1998) *Nature* **392**: 941-945.
46. Grzelakowska-Sztabert B (1998) *Post Biochem* **44**: 8-21
47. Heller R A, Krönke M (1994) *J Cell Biol* **126**: 5-9
48. Adam D, Weigmann K, Adam-Klages S, Ruff A, Kronke M (1996) *J Biol Chem* **271**: 14617-14622
49. Wiegmann K, Schwandner R, Krut O, Yeh W-C, Mak T W, Krönke M (1999) *J Biol Chem* **274**: 5267-5270
50. Schwandner R, Wiegmann K, Bernardo K, Kredder D, Krönke M (1998) *J Biol Chem* **273**: 5916-5922
51. Ballou L R, Laulederkind S J, Rosloniec E F, Raghoebar R (1996) *Biochim Biophys Acta* **1301**: 273-287
52. Natoli G, Costanzo A, Ianni A, Templeton D J, Woodgett J R, Balsano C, Levrero M (1997) *Science* **275**: 200-203
53. Song H Y, Regnier C H, Kirschning C J, Goeddel D V, Rothe M (1997) *Proc Natl Acad Sci USA* **94**: 9792-9796
54. Pena L A, Fuks Z, Kolesnick R (1997) *Biochem-Pharmacol* **53**: 615-621
55. Sen R, Baltimore D (1986) *Cell* **46**: 705-716
56. Foo S Y, Nolan G P (1999) *TIG* **15**: 229-235
57. Baeuerle P A (1998) *Cell* **95**: 729-731
58. Verma I M, Stevenson J K, Schwarz E M, Van Antwerp D, Miyamoto S (1995) *Genes Dev* **9**: 2723-2735
59. Huxford T, Huang D-B, Malek S, Ghosh G (1998) *Cell* **95**: 759-770
60. Reichsteiner M (1990) *Semin Cell Biol* **1**: 433-440
61. Malek S, Huxford T, Ghosh G (1998) *J Biol Chem* **273**: 25427-25435
62. Zabel U, Schreck R, Bauerle P A (1991) *J Biol Chem* **266**: 252-260
63. Arenzana-Seisdedos F, Thompson J, Rodriguez M S, Bachelier F, Thomas D, Hay R T (1995) *Mol Cell Biol* **15**: 2689-2696
64. Arenzana-Seisdedos F, Turpin P, Rodriguez M, Thomas D, Hay R T, Virelizier J L, Dargemont C (1997) *J Cell Sci* **110**: 369-378
65. Kelliher M A, Grimm S, Ishida Y, Kuo F, Stanger B Z, Leder P (1998) *Immunity* **8**: 297-303
66. Yeh W-C, Shahinian A, Speiser D, Kraunus J, Billia F, Wakeham A, de la Pompa J L, Ferrick D, Hum B, Iscove N, Ohashi P, Rothe M, Goeddel D V, Mak T W (1997) *Immunity* **7**: 715-725
67. Malinin N L, Boldin M P, Kovalenko A V, Wallach D (1997) *Nature* **385**: 540-544
68. Awane M, Andres P G, Li D J, Reinecker H C (1999) *J Immunol* **162**: 5337-5344
69. Yin L, Wu L, Wesche H, Arthur C D, White J M, Goeddel D V, Schreiber R D (2001) *Science* **291**: 2162-2165
70. Matsushima A, Kaisho T, Rennert P D, Nakano H, Kurosawa K, Uchida D, Takeda K, Akira S, Matsumoto M (2001) *J Exp Med* **193**: 631-636
71. Connelly M A, Marcu K B (1995) *Cell Mol Biol Res* **41**: 537-549
72. Regnier C H, Song H Y, Gao X, Goeddel D V, Cao Z, Rothe M (1997) *Cell* **90**: 373-383
73. DiDonato J A, Hayakawa M, Rothwarf D M, Zandi E, Karin M. (1997) *Nature* **388**: 548-554
74. Mercurio F, Zhu H, Murray B W, Shevchenko A, Bennet B L, Li J, Young D B, Barbosa M, Mann M, Manning A, Rao A (1997) *Science* **278**: 860-866
75. Woronicz J D, Gao X, Cao Z, Rothe M, Goeddel D V (1997) *Science* **278**: 866-869
76. Ling L, Cao Z, Goeddel D V (1998) *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 3792-3797
77. Li Q, Van Antwerp D J, Mercurio F, Lee K-F, Verma I M (1999) *Science* **284**: 321-325

78. Delhase M., Hayakawa M., Chen L, Karin M (1999) *Science* **284**: 309-313
79. Takeda K, Takeuchi O, Tsujimura T, Itami S, Adachi O, Kawai T, Sanjo H, Yoshikawa K, Terada N, Akira S (1999) *Science* **284**: 313-316
80. Zandi E, Rothwarf D M, Delhase M, Hayakawa M, Karin M (1997) *Cell* **91**: 243-252
81. Rothwarf D M, Zandi E, Natoli G, Karin M (1998) *Nature* **395**: 297-300
82. Yamaoka S, Courtois G, Bessia C, Whiteside S, Weil R, Agou F, Kirk H E, Kay R J, Israel A (1998) *Cell* **93**: 1231-1240
83. Li Y, Kang J, Friedman J, Tarassishin L, Ye J, Kovalenko A, Wallach D, Horvitz M S (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**: 1042-1047
84. Mercurio F, Murray B W, Shevchenko A, Bennet B L, Young D B, Li J W, Pascual G, Motiwala A, Zhu H, Mann M, Manning A M (1999) *Mol Cell Biol* **19**: 1526-1538
85. Inohara N, Koseki T, Lin J, del Peso L, Lucas P C, Chen F F, Ogura Y, Nunez G (2000) *J Biol Chem* **275**: 27823-27831
86. Poyet J-L, Srinivasula S M, Lin J, Fernandes-Alnemri T, Yamaoka S, Tsichlis P N, Alnemri E S (2000) *J Biol Chem* **275**: 37966-37977
87. Cohen L, Henzel W J, Baeuerle P A (1998) *Nature* **395**: 292-296
88. Krappmann D, Hatada E N, Tegethoff S, Li J, Klippel A, Giese K, Baeuerle P A, Scheidereit C (2000) *J Biol Chem* **275**: 29779-29787
89. Shimada T, Kawai T, Takeda K, Matsumoto M, Inoue J-I, Tatsumi Y, Kanamaru A, Akira S (1999) *Intl Immunol* **11**: 1357-1362
90. Pomerantz J L, Baltimore D (1999) *EMBO J* **18**: 6694-6704
91. Tojima Y, Fujimoto A, Delhase M, Chen Y, Hatakeyama S, Nakayama K, Kaneko Y, Nimura Y, Motoyama N, Ikeda K, Karin M, Nakanishi M (2000) *Nature* **404**: 778-782
92. Maniatis T (1997) *Science* **278**: 818-819
93. Ozes O N, Mayo L D, Gustin J A, Pfeffer S R, Pfeffer L M, Donner D B (1999) *Nature* **401**: 82-85
94. Madge L A, Pober J S (2000) *J Biol Chem* **275**: 15452-15465
95. Hirano M., Osada S, Aoki T, Hirai S, Hosaka M., Inoue J, Ohno S (1996) *J Biol Chem* **271**: 13234-13238
96. Lee F S, Peters R T, Dang L C, Maniatis T (1998) *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 9319-9324
97. Nakano H, Shind M, Sakon S, Nishinaka S, Mihara M, Yagita H, Okumura K (1998) *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 3537-3542
98. Nemoto S, DiDonato J A, Lin A (1998) *Mol Cell Biol* **18**: 7336-7343
99. Baud V, Liu Z-G, Bennett B, Suzuki N, Xia Y, Karin M (1999) *Genes Dev* **13**: 12997-1308
100. Yuriji T, Ware M, Widmann C, Oyer R, Russell D, Chan E, Zaitzu Y, Clarke P., Tyler K, Oka Y, Fanger G R, Henson P., Johnson G L (2000) *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 7272-7277
101. Zhao Q, Lee F S (1999) *J Biol Chem* **274**: 8355-8358
102. Vanden Berghe W, Plaisance S, Boone E, De Bosscher K, Schmitz M L, Fiers W, Haegeman G (1998) *J Biol Chem* **273**: 3285-3290
103. Carpentier I, Declercq W, Malinin N L, Wallach D, Fiers W, Beyaert R (1998) *FEBS Lett* **425**: 195-198
104. Vig E, Green M., Liu Y, Bonner D B, Mukaida N, Goeb M G, Harrington M A (1999) *J Biol Chem* **274**: 13077-13084
105. Bonizzi G, Piette J, Schoonbroodt S, Merville M P, Bours V (1999) *Biochem Pharmacol* **57**: 713-720
106. Bergmann M., Hart L, Lindsay M, Barnes P J, Newton R (1998) *J Biol Chem* **273**: 6607-6610
107. Bonnet M C, Weil R, Dam E, Hovanessian A G, Meurs E F (2000) *Mol Cell Biol* **20**: 4532-4542
108. Wang D, Baldwin A S Jr (1998) *J Biol Chem* **273**: 29411-29416
109. Martin A G, Fresno M (2000) *J Biol Chem* **275**: 24383-24391
110. Jaattela M, Mouritzen H, Elling F, Bastholm? (1996) *J Immunol* **156**: 1166-1173
111. Song H Y, Rothe M, Goeddel D V (1996) *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 6721-6725
112. Heyninck K, De Valck D, Van Den Berghe W, Van Crieckinge W, Contreras R, Fiers W, Heegeman G, Beyaert R (1999) *J Cell Biol* **145**: 1471-1482
113. Zhang S Q, Kovalenko A, Cantarella G, Wallach D (2000) *Immunity* **12**: 301-311
114. Wang C Y, Mayo M W, Korneluk R G, Goeddel D V, Baldwin A S Jr (1998) *Science* **281**: 1680-1683
115. Carpentier I, Beyaert R (1999) *FEBS Lett* **460**: 246-250
116. Schwenger R, Siemienski K, Liptay S, Schubert G, Peters N, Scheurich P, Schmid R M, Wajant H (1999) *J Biol Chem* **274**: 19368-19374
117. Pype S, Declercq W, Ibrahim A, Michiels C, Van Rietschoten J G I, Dewulf N, de Boer M, Vandenabeele P., Huylebroeck D, Remacle J E (2000) *J Biol Chem* **275**: 18586-18593
118. Yamamoto Y, Gaynor R B (2001) *J Clin Invest* **107**: 135-142
119. Wang C-Y, Mayo M W, Baldwin Jr A S (1996) *Science* **274**: 784-787
120. Van Antwerp D J, Martin S J, Kafri T, Green D R, Verma I M (1996) *Science* **274**: 787-789
121. Beg A A, Baltimore D (1996) *Science* **274**: 782-784
122. Wong G H, Goeddel D V (1988) *Science* **242**: 941-944
123. Wong G H, Elwell J H, Oberley L W, Goeddel D V (1989) *Cell* **58**: 923-931
124. Natoli G, Costanzo A, Guido F, Moretti F, Bernardo A, Burgio V L, Agresti C, Levrero M (1998) *J Biol Chem* **273**: 31262-31272
125. Wang C-Y, Cusack J C, Liu R, Baldwin A S Jr (1999) *Nat Med* **5**: 412-417
126. Higgins K A, Perez J R, Coleman T A, Dorshkind K, McComas W A, Sarmiento U M, Rosen C A, Narayanan R (1993) *Proc Natl Acad Sci USA* **90**: 9901-9905
127. Chandra J, Niemer I, Gilbreath J, Kliche K-O, Andreeff M, Freireich E J, Keating M, McConkey D J (1998) *Blood* **92**: 4220-4229
128. Orłowski R Z, Eswara J R, Lafond-Walker A, Grever M R, Orłowski M, Dang C V (1998) *Cancer Res* **58**: 4342-4348
129. Yin M-J, Yamamoto Y, Gaynor R B (1998) *Nature* **396**: 77-80
130. Wahl C, Liptay S, Adler G, Schmidt R M (1997) *J Clin Invest* **101**: 1163-1174
131. Rossi A, Kapahi P, Natoli G, Takehashi T, Chen Y, Karin M, Santoro M G (2000) *Nature* **403**: 103-108
132. Stein C A, Cheng Y-C (1993) *Science* **261**: 1004-1011

# Zwierzęce kinazy tyrozynowe

## Animal protein tyrosine kinases

JOANNA TROJANEK

### Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Receptorowe kinazy tyrozynowe
- III. Niereceptorowe kinazy tyrozynowe
- IV. Udział białkowych kinaz tyrozynowych w procesie przekazywania sygnałów
- V. Onkogenny charakter białkowych kinaz tyrozynowych
- VI. Inhibitory kinaz tyrozynowych i ich potencjalne zastosowanie w terapii
- VII. Uwagi końcowe

**Wykaz stosowanych skrótów:** R — receptor; EGF — czynnik wzrostu naskórka (ang. *Epidermal Growth Factor*); FGF — czynnik wzrostu fibroblastów (ang. *Fibroblast Growth Factor*); HGF — czynnik wzrostu hepatocytów (ang. *Hepatocyte Growth Factor*); IGF-1 — insulinopodobny czynnik wzrostu (ang. *Insulin-like Growth Factor-1*); PDGF  $\alpha$ ,  $\beta$  — czynnik wzrostu pochodzący z płytek krwi, typu  $\alpha$  i  $\beta$  (ang. *Platelet Derived Growth Factor*); VEGF — czynnik wzrostu komórek nabłonka naczyń (ang. *Vascular Endothelial Cell Growth Factor*); PTK — typowe, białkowe kinazy tyrozynowe (ang. *Protein Tyrosine Kinase*); SH2, SH3 — domeny homologiczne do kinazy Src (ang. *Src Homology Domain*); c-Src — komórkowa kinaza Src (ang. *cellular kinase Src*); v-Src — wirusowa kinaza Src (ang. *virus kinase Src*).

### I. Wstęp

Odwracalna fosforylacja reszt tyrozyny w białkach pełni ważną funkcję w regulacji różnorodnych procesów fizjologicznych w organizmach eukariotycznych. Fosforylacja tyrozyny uczestniczy w kaskadach przekazywania sygnałów umożliwiając kontrolę wzrostu i różnicowania się komórek w odpowiedzi na działanie hormonów, cytokin i czynników wzrostu. Kontroluje ona prawidłowy przebieg procesów mitozy i apoptozy, zapewniając utrzymanie stanu homeostazy w komórkach [1].

Dr; Instytut Biochemii i Biofizyki PAN, ul. Pawińskiego 5a, 02-106 Warszawa, tel. 659 70 72 wew. 5717, e-mail: joanna@ibb.waw.pl

### Contents:

- I. Introduction
- II. Receptor protein tyrosine kinases
- III. Non-receptor protein tyrosine kinases
- IV. Role of protein tyrosine kinases in signal transduction
- V. Oncogenic character of protein tyrosine kinases
- VI. Inhibitors of protein tyrosine kinases and their potential application in therapy
- VII. Concluding remarks

Analiza sekwencji genomu człowieka wykazała, że w tym genomie znajduje się 106 genów, przypuszczalnie kodujących białkowe kinazy tyrozynowe (The Human Genome, *Science* 2001).

Ze względu na lokalizację i pełnione w komórce funkcje kinazy tyrozynowe można podzielić na kinazy receptorowe i niereceptorowe.

### II. Receptorowe kinazy tyrozynowe

Zasadniczą rolą większości receptorowych kinaz tyrozynowych jest rozpoznawanie i wiązanie czynników wzrostu. Struktura i funkcja receptorów czynników wzrostu była już wcześniej obszernie omawiana m. in. kilkakrotnie w „*Postęпах Biochemii*” [2, 3] oraz innych pracach [4]. W tym artykule przedstawiono więc jedynie zaktualizowane dane dotyczące tego tematu.

Typowe receptorowe kinazy tyrozynowe (RPTKs, ang. *Receptor Protein Tyrosine Kinases*) są białkami błonowymi. Można w nich wyróżnić następujące elementy składowe: domenę zewnątrzkomórkową, domenę transbłonową, domenę łącznikową, cytoplazmatyczną domenę zawierającą kinazę tyrozynową oraz fragment C-końcowy.

Domena zewnątrzkomórkowa — jest to domena N-końcowa, w skład której wchodzi od 500 do 850 reszt aminokwasowych. W obrębie tej domeny znajduje się miejsce wiążące ligand. Zarówno sekwencja aminokwasowa, jak i struktura trzeciorzędowa tej domeny są bardzo zróżnicowane, co związane jest z

rozpoznawaniem i wiązaniem różniących się budową ligandów oraz odmiennymi funkcjami fizjologicznymi, jakie pełnią poszczególne cząsteczki receptorowe zaliczane do tej rodziny kinaz.

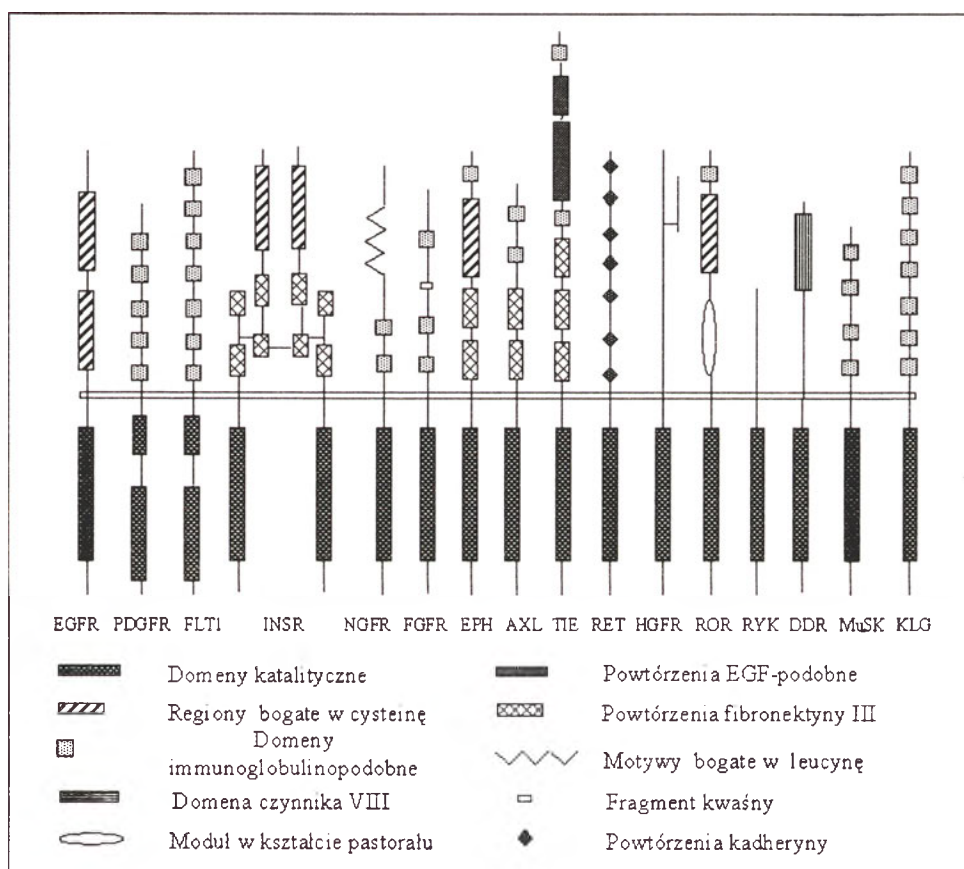
W skład domeny transbłonowej wchodzi około 22-26 reszt aminokwasowych, z których większość stanowią aminokwasy o charakterze hydrofobowym.

Sekwencja domeny łącznikowej, oddzielającej domenę kinazy tyrozynowej od powierzchni błony komórkowej ma długość od 41 do 50 aminokwasów.

łańcuchach bocznych, co zapewnia dużą elastyczność konformacyjną tej domeny [5].

Ze względu na różnice w budowie domeny zewnątrzkomórkowej receptora, kinazy tyrozynowe tej grupy zostały podzielone na 16 odrębnych rodzin (Ryc. 1). Ponadto wyróżniono kilka indywidualnych typów, nie należących do żadnej z rodzin receptorowych kinaz tyrozynowych [1, 6]

Przyłączenie ligandu do zewnątrzkomórkowej domeny receptora indukuje dimeryzację receptorów.



Ryc. 1. Rodziny receptorowych kinaz tyrozynowych (Schemat wg. Hunter 1998, modyfikowany).

Do dnia dzisiejszego nie została doświadczalnie wykazana rola, jaką domena łącznikowa pełni w przekazywaniu sygnałów przez błonę plazmatyczną.

Cytoplazmatyczna domena posiadająca aktywność kinazy tyrozynowej jest najistotniejszą domeną dla procesu przekazywania sygnałów. Kinazy tyrozynowe wyróżniają się wysokim stopniem homologii sekwencji w obrębie tej domeny.

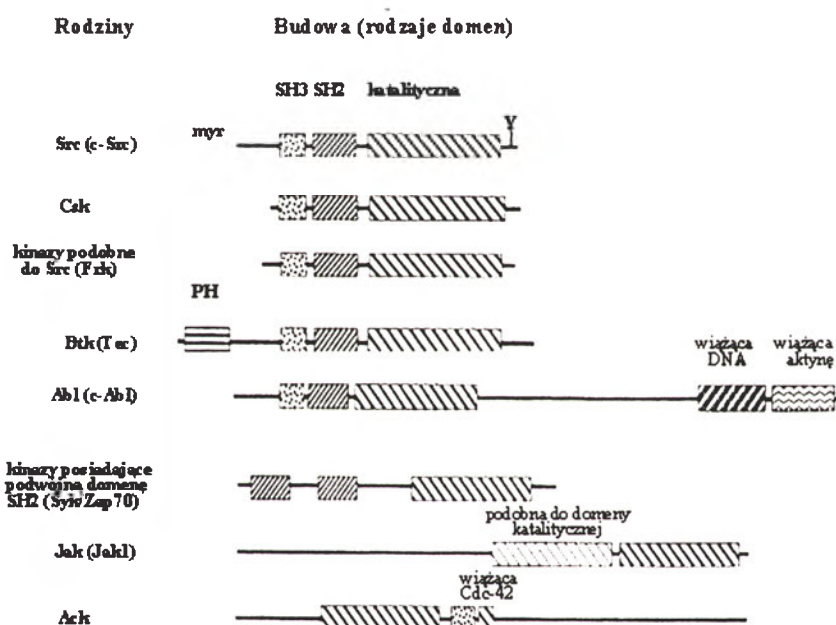
Domena C-końcowa — charakteryzuje się dużym stopniem zmienności zarówno pod względem długości sekwencji (70-200 aminokwasów), jak i struktury trzeciorzędowej. Region ten zbudowany jest głównie z reszt aminokwasowych o charakterze hydrofobowym i bogaty w reszty aminokwasowe o krótkich

Dimeryzacja receptorów jest mechanizmem pozwalającym na przeniesienie sygnału zmiany konformacyjnej z domeny zewnątrzkomórkowej do domeny cytoplazmatycznej bez zmian w strukturze domeny transbłonowej [7]. W wyniku auto- i transfosforylacji jednej lub kilku reszt tyrozynowych w katalitycznych domenach cytoplazmatycznych receptorów, które po dimeryzacji znajdują się blisko siebie, enzymy te zdolne są do fosforylacji specyficznych substratów, co zapoczątkowuje szlak przekazywania sygnałów w komórce [1]. Mechanizm aktywacji receptora poprzez jego dimeryzację ma charakter uniwersalny i cechuje wszystkie klasy receptorów czynników wzrostu [4].

### III. Niereceptorowe kinazy tyrozynowe

Niereceptorowe kinazy tyrozynowe stanowią grupę enzymów, których wspólną cechą jest brak domeny zewnątrzkomórkowej. Niektóre z tych enzymów (np. c-Src) mogą być związane z błoną komórkową poprzez asocjację z innymi białkami występującymi w błonie komórkowej. Większość niereceptorowych PTK występuje wyłącznie w cytoplazmie, ale niektóre z nich mogą występować zarówno w cytoplazmie, jak i w jądrze (c-Abl). Do dzisiaj poznano około 36 niereceptorowych kinaz tyrozynowych tworzących oddzielne rodziny [8], co ilustruje Ryc. 2.

la aktywności komórkowego białka c-Src przez autoinhibicję, zachodząca w wyniku wiązania domeny SH2 do ufosforylowanej Tyr w C-końcowym regionie enzymu (Tyr 527), co uniemożliwia łączenie kinazy z substratem. Białko v-Src jest produktem genu, biorącego udział w transformacji nowotworowej komórek przez wirus sarkomy Rous'a (RSV). v-Src nie jest zdolny do autoinhibicji, gdyż białko wirusowe w pozycji 527 zamiast tyrozyny posiada fenyloalaninę. W konsekwencji, v-Src jest enzymem konstytutywnie aktywnym, nie podlegającym procesom regulacyjnym. Nieograniczona fosforylacja substratów przez aktywne białko v-Src pobudza komórki do nie-



Ryc. 2. Rodziny niereceptorowych kinaz tyrozynowych (Schemat wg. Hunter, 1998, modyfikowany).

Najlepiej poznana jest rodzina kinaz Src, w skład której wchodzi dziewięć spokrewnionych ze sobą kinaz niereceptorowych. Kinazy rodziny Src uczestniczą w szlakach przewodzenia sygnałów w komórce, kontrolując wzrost i różnicowanie komórek w odpowiedzi na aktywację receptorów czynników wzrostu i cytokin. Najwcześniej poznany przedstawicielem tej rodziny jest białko Src, które zostało opisane wcześniej w „Postęпах Biochemii” [9]. W komórce eukariotycznej białko to może występować w dwóch formach, jako białko wirusowe (v-Src, ang. *virus-Src*) oraz jako białko komórkowe (c-Src, ang. *cellular-Src*). Obie te formy charakteryzuje wysoka homologia sekwencji aminokwasów. Jedyne na C-końcu, 19 aminokwasów obecnych w c-Src, zastąpionych jest przez 12 innych aminokwasów w v-Src [10]. Zasadniczą różnicą jest natomiast kontro-

ustannej proliferacji, wywołując powstanie nowotworu, jest więc onkogenem [11].

Białko c-Src (oznaczane wcześniej pp60<sup>c-src</sup>) na N-końcu zawiera region zbudowany z 9-12 aminokwasów, do którego przyłączony jest kwas mirystylowy (Ryc. 2). Za pośrednictwem tego kwasu białko Src zakotwiczone jest w błonie cytoplazmatycznej komórki. W sekwencji N-końcowej tego białka wyróżnić można również obszar 40-70 aminokwasów, unikalny dla każdej z kinaz należących do tej rodziny, który określa ich odrębne właściwości.

Niereceptorowe kinazy tyrozynowe odznaczają się występowaniem charakterystycznych domen, co umożliwia przenoszenie sygnałów (Ryc. 2). Są to przede wszystkim domeny SH2 i SH3 (SH, ang. *Src Homology Domain*), zbudowane z około 50-100 aminokwasów. Domena SH2 w białku c-Src wiąże się do

sekwencji: [P-Tyr]-E-E-I, czyli rozpoznaje ona P-tyrozinę w krótkich peptydowych sekwencjach najczęściej od 1 do 5 aminokwasów, położone za fosforylowaną resztą tyrozyny P-Tyr [12]. Natomiast domena SH3 jest globularną domeną zbudowaną z około 60 reszt aminokwasowych, która specyficznie rozpoznaje siedmioaminokwasowe sekwencje bogate w prolinę [13].

Kolejną domeną występującą w niereceptorowych kinazach tyrozynowych jest domena wykazująca homologię do plekstryny (PH, ang. *Pleckstrin Homology Domain*). Występuje ona również w wielu kinazach białkowych serynowo/treoninowych, substratach kinaz białkowych, izoformach fosfolipazy C, białkach regulacyjnych małych GTP-az oraz białkach cytoszkieletowych. Domena PH posiada strukturę globularną składającą się z 120 aminokwasów i wiąże swoiście cząsteczki fosfolipidów. Zbudowana jest ona z dwóch siedmioskrotnych, pionowych struktur  $\beta$  oraz C-końcowej amfipatycznej  $\alpha$ -helisy [13]. Domena PH może oddziaływać jako zależna od fosfolipidów domena wiążąca kinazy do błony cytoplazmatycznej [1].

W poszczególnych typach niereceptorowych kinaz tyrozynowych, występują także charakterystyczne dla tych kinaz inne domeny [1]. W rodzinie kinaz Abl są to: domena wiążąca DNA i domena wiążąca aktywną. Natomiast kinazy Jak posiadają dwie domeny katalityczne: jedną właściwą i drugą częściowo homologiczną do domeny katalitycznej. Dla rodziny Ack charakterystyczna jest domena wiążąca czynnik Cdc-42 [8] (Ryc. 2)

W procesach przekazywania sygnału w komórce docelowej opisane powyżej domeny (SH2, SH3, PH) rozpoznają i wiążą się do różnorodnych białek. Białka te można podzielić na cztery grupy, w zależności od pełnionych przez nie funkcji:

- enzymy: kinazy tyrozynowe (np. Src, Abl, Zap70, Syk), fosfataza tyrozynowa (Shp), fosfolipaza fosfoinozytolu (PLC $\gamma$ ), kinaza fosfoinozytolu (PI-3 p180), aktywator Ras GTP-azy (GAP);
- białka adaptorowe (Shc, Nck, Crk, Slap, Grb 2, Gap 1);
- białka „zakotwiczące” (ang. *docking proteins*) (IRS, p130 Cas, Cbl);
- białka strukturalne (aneksyna, ezryna, winkulina, talina, tenystyna, p80/85, katheryny, integryny) [1].

#### IV. Udział białkowych kinaz tyrozynowych w procesie przekazywania sygnałów

Nadrzędną funkcją fosforylacji tyrozyny jest przekazywanie sygnałów w komórce. Receptorowe kinazy tyrozynowe mają wiele miejsc autofosforylacji i w stanie aktywnym wiążą dostępne białka zawierające domenę SH2 lub PTB (\*).

I tak receptor PDGF $\beta$  może jednocześnie wiązać osiem białek zawierających domeny SH2: kinazy z rodziny Src, większą podjednostkę regulatorową p110 kinazy 3-fosfatydyloinozytolu (PI-3k), fosfolipazę C (PLC $\gamma$ 1), białko aktywujące GTPazę (GAP), fosfatazę tyrozynową Shp2 (Syp), negatywny regulator (Slap), białka adaptorowe Nck oraz Grb2 [6] (Ryc. 3).

Przekazywanie sygnałów za pośrednictwem białka Grb2 występuje zarówno przez receptory typu PDGF $\beta$ , jak i EGF. Białko Grb2 posiadające centralną domenę SH2, otoczoną dwoma domenami SH3 jest konstytutywnie związane za pośrednictwem domen SH3 z białkiem efektorowym SOS [14]. SOS jest czynnikiem wymieniającym GDP na GTP (ang. *GTP — exchange factor*) dla Ras — małego białka G związanego z błoną. SOS aktywuje Ras przez wymianę nukleotydu GDP na GTP. Białko Ras aktywuje następnie kaskadę kinaz MAP. Po związaniu z Ras kompleks Grb2/SOS jest przenoszony do błony, gdzie domena PH białka SOS może oddziaływać z fosfolipidami błony plazmatycznej, stabilizując jego wiązanie z błoną (Ryc. 3). Kompleks Grb2/SOS powstaje również pod wpływem sygnałów pochodzących od transbłonowych i binarnych czynników wzrostu, onkogennych kinaz tyrozynowych (np. v-Src), NGF, receptora insuliny oraz pod wpływem utworzenia kompleksu integryny z binarnym receptorem Fak. Ten system jest wykorzystywany do odbierania sygnałów ze środowiska zewnętrznego i umożliwia wiele różnorodnych rodzajów odpowiedzi komórkowej [1].

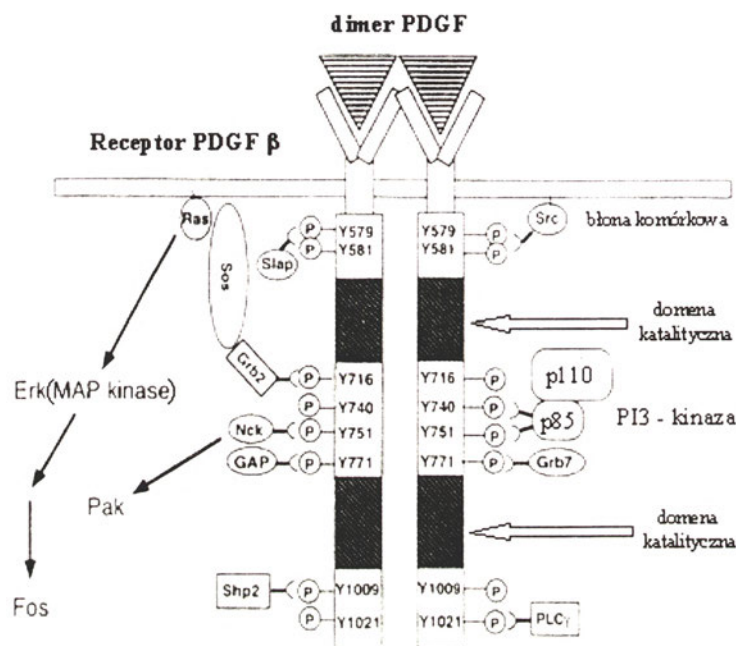
Fosforylacja reszt tyrozyny w cząsteczce receptora czynnika wzrostu nerwu (NGFR) indukuje ekspresję czynników transkrypcyjnych AP-1 i AP-2 (AP, ang. *Activator Protein*) oraz genów wczesnej odpowiedzi komórkowej (NGFI — A, B, C) i genu VGF. Indukowane przez NGF czynniki transkrypcyjne biorą udział w regulacji ekspresji genów kodujących białka związane z procesami neurotransmisji i neuro-

(\*) PTB jest domeną globularną zbudowaną z około 150-200 aminokwasów. Rozpoznaje ona od 1 do 8 reszt aminokwasowych leżących przed fosforylowaną resztą tyrozyny, w zachowywanej ewolucyjnie sekwencji: N-P-X-[P-Tyr] [1;14].

modulacji. Istnieje kilka szlaków przekazywania sygnału w komórkach neuronalnych w odpowiedzi na sygnał przyłączenia NGF, co zostało opisane w „*Postęпах Biochemii*” [15].

Natomiast w szlaku Jak/STAT fosforylacja tyrozyny w białku STAT przez kinazę Jak jest potrzebna do dimeryzacji, a następnie translokacji dimeru STAT do jądra i związania z DNA [16].

rek tucznych do cytozolu komórek efektorowych odpowiedzi immunologicznej. Dodatkowo kinazy białkowe z tej rodziny asocjują z białkami powierzchniowymi CD2, CD4, CD5 i CD28 komórek układu krwiotwórczego, co wzmacnia potencjał przesyłania sygnałów z innych receptorów. Kinaza c-Src jest aktywowana w wybranych typach komórek krwiotwórczych przez czynniki wzrostu oraz



Ryc. 3. Przekazywanie sygnału przez kinazę tyrozynową receptora PDGF (Schemat wg. Hunter 1998, modyfikowany).

Kinazy należące do rodziny FGFR są niezbędne dla ograniczenia wzrostu chondrocytów w procesie rozwoju kości [17]. Receptorowe kinazy tyrozynowe rodzin VEGF oraz Tie są konieczne dla prawidłowego przebiegu procesu angiogenezy, zapewniając skoordynowany wzrost i różnicowanie komórek nabłonkowych oraz mięśni gładkich potrzebnych dla zachowania odpowiedniego kształtu naczyń krwionośnych [18, 19].

Kinazy tyrozynowe mają także wpływ na prawidłowe funkcjonowanie zróżnicowanych komórek. Degranulacja komórek tucznych po związaniu kompleksu: antygen/przeciwciało przez powierzchniowe receptory Fc wymaga obecności kinaz tyrozynowych z rodziny Src. Aktywność kinazy c-Src wpływa także w decydujący sposób na funkcję osteoklastów w resorpcji kości, zapobiegając wystąpieniu procesu osteopetrozy czyli zahamowaniu resorpcji kości przez osteoklasty [20]. Ponadto, kinaza c-Src uczestniczy w przenoszeniu sygnałów od pobudzonych receptorów (takich, jak receptor antygenu komórek T, receptor antygeny komórek B oraz receptor o wysokim powinowactwie dla IgE) komó-

cząsteczki interleukiny-2 i interleukiny-3. Kinaza c-Src jest także odpowiedzialna za przepływ informacji wewnątrzkomórkowej generowanej w wyniku aktywacji receptorowych kinaz tyrozynowych, takich jak PDGFR i CSF-1R [8].

Białkowe kinazy tyrozynowe uczestniczą również w transdukcji sygnałów w płytkach krwi w odpowiedzi na działanie zewnątrzkomórkowych stymulatorów m. in. trombiny, ADP, kolagenu, czy też czynnika aktywującego (PAF), co szerzej jest opisane w „*Postęпах Biochemii*” [9].

Natomiast cytoplazmatyczna kinaza tyrozynowa Bmx, której gen zidentyfikowano na chromosomie X jest członkiem rodziny Btk/Emt/Tec/Txk. Duże stężenia transkryptu genu BMX, znaleziono w komórkach linii hematopoetycznych. Wydaje się, że Bmx może brać udział w transdukcji sygnałów w komórkach hematopoetycznych, jak również w komórkach endokardialnych i nabłonkowych naczyń [21].

Podsumowując, fosforylacja reszt tyrozyny spełnia wiele funkcji fizjologicznych tkankowo specyficznych, uczestnicząc w regulacji procesów wzrostu, rozwoju i różnicowania komórek.



## V. Onkogenny charakter białkowych kinaz tyrozynowych

W procesie nowotworowym uczestniczy wiele pojedynczych szlaków przekazywania sygnałów, które niezależnie od siebie zaburzają regulację podstawowych procesów komórkowych. I tak na przykład zaburzenie w szlaku sygnałnym białka Ras powoduje niekontrolowaną proliferację, w szlaku retinoblastomy zmienia kontrolę cyklu komórkowego, w szlaku białka p53 powoduje apoptozę itd. Zaburzone współdziałanie tych szlaków składa się ostatecznie na rozwój pełnej, złośliwej postaci raka [22].

Receptorowe i niereceptorowe kinazy tyrozynowe oraz ich substraty w szlakach transdukcji sygnałów mogą funkcjonować jako onkogeny. Jedną z przyczyn, która powoduje onkogenność kinaz tyrozynowych są mutacje w proto-onkogenach je kodujących. Na przykład proto-onkogen *c-ret* (kodujący kinazę receptorową, która zawiera w domenie zewnątrzkomórkowej struktury podobne do katheryny o nieznanym ligandzie) ulega mutacjom albo powoduje rearanżacje innych genów, w wyniku których powstający produkt białkowy powoduje kilka rodzajów endokrynnej neoplazji typu 2 (MEN2). Inny rodzaj mutacji występuje międzychromosomowo, jako translokacja i fuzja sekwencji BCR (ang. *Breakpoint Cluster Region*) z ludzkiego chromosomu 22 do fragmentu długiego ramienia chromosomu 9, w którym kodowana jest kinaza tyrozynowa *c-ABL*. Powstaje chimeryczny gen BCR-ABL, którego produkt ma aktywność kinazy tyrozynowej o kilkakrotnie wyższej aktywności niż normalna kinaza *c-Abl*, co powoduje transformację fibroblastów i szybko postępującą leukemię (białaczkę) u dorosłych. Stwierdzono, że wiele rodzajów białaczek jest spowodowanych translokacją i fuzją różnych fragmentów chromosomów. Na przykład wspomniany już gen kinazy ABL łączy się z genem kodującym czynnik transkrypcyjny TEL z chromosomu 12. Produkt tego chimerycznego genu wykazuje zwiększoną aktywność kinazy tyrozynowej ABL. Zidentyfikowano również fuzję genu TEL z kinazą receptorową PDGFR $\beta$  na chromosomie 5. Produkt tego fuzyjnego białka wykazuje zwiększoną homodimeryzację receptorów i aktywację kinazy po związaniu liganda, co jest przyczyną transformacji monocytów w krwi i szpiku oraz zaburzeń w normalnym rozwoju i produkcji komórek krwi. Mutacje zachodzące w domenach transbłonowych i zewnątrzkomórkowych kinaz receptorowych mogą prowadzić do aktywacji kinaz niezależnie od ligandów, co stwierdzono u kinaz receptorowych wyizolowanych

z wirusów onkogennych. Ponadto, delecja części regulatorowej kinaz tyrozynowych także prowadzi do onkogennej aktywacji tych enzymów [23].

Oprócz mutacji, kolejnym mechanizmem onkogennej aktywacji kinaz tyrozynowych jest tzw. zamknięcie w „autokrynną pętlę wzrostu” (ang. *autocrine growth loops*). Zjawisko to występuje w przypadku anormalnej ekspresji lub nadekspresji typowej kinazy tyrozynowej, która zachodzi w obecności asocjującego z nią ligandu lub nadekspresji ligandu w obecności normalnego receptora. Taki mechanizm transformacji opisano dla EGFR, czynnika stymulującego proliferację i różnicowanie komórek prekursorowych krwi (CSF-1R, ang. *Colony Stimulating Factor-1 Receptor*), IGF-1R, MET (receptor czynnika rozproszenia, należący do rodziny HGFR) i PDGFR. Mechanizm ten jest przyczyną wielu form glioblastomy oraz nowotworów takich narządów jak: pęcherza moczowego, piersi, płuc, prostaty i żołądka. Szczególnie zwiększona ekspresja proto-onkogenów kinaz rodziny EGFR, tj. EGFR, *erbB-2* lub *HER-2/NEU* (skrót pochodzi od nazwy nowotworu, z którego został wyizolowany, np. *erb* ang. *erythroblastoma*; *neu* ang. *neuroblastoma*; *HER* — analog onkogenu *neu* u ludzi), *erbB-3* lub *erbB-4* jest przyczyną wielu nowotworów [23].

Trzeci rodzaj mechanizmów obejmuje takie zmiany w regulacji kinaz tyrozynowych, które wpływają na ich aktywność. Są to na przykład mutacje w białkach pełniących funkcje negatywnych regulatorów szlaków przekazywania sygnałów, zarówno kinaz, jak i fosfataz. W przypadku raka jelita grubego obserwowano średnio 15-krotnie wyższą aktywność kinazy *Src* w stosunku do aktywności w normalnych komórkach. Rak ten, drugi pod względem częstotliwości występowania po raku płuc, stanowi blisko 15% wszystkich nowotworów złośliwych. W komórkach nowotworów rozsianych (złośliwych) aktywność *Src* wzrasta średnio 90-krotnie. W tych komórkach występuje także 5-krotna nadekspresja kinazy *Src*. Przypuszcza się, że przyczyną tak drastycznie zwiększonej aktywności tej kinazy są zarówno zmiany w regulacji aktywności, zwiększona ekspresja, jak i zmiany w samym białku *Src*.

Dla szybkiego wzrostu guza i rozsiania komórek nowotworowych ogromne znaczenie ma proces tworzenia naczyń krwionośnych. Tutaj także ważną rolę odgrywają receptorowe kinazy tyrozynowe i ich ligandy jak np. nabłonkowy czynnik wzrostu naczyń – VEGF. Oddziałuje on z dwoma typami receptorów o dużym powinowactwie do VEGF z wewnętrzną aktywnością kinaz tyrozynowych: VEGFR-1/FLT-1 (ang. *Fms-Like Tyrosine Kinase-1*) i VEGFR-2/

FLK-1 (ang. *Fetal Liver Kinase-1*) /KDR (ang. *Kinase Insert Domain Containing Receptor*) [23; 24].

## VI. Inhibitory kinaz tyrozynowych i ich potencjalne zastosowanie w terapii

W komórkach wielu typów nowotworów można zaobserwować zaburzenia przekazywania sygnałów mitogennych wskutek zmian aktywności kinaz tyrozynowych. Zmiany te mogą być przyczyną powstawania nowotworów, a także niektórych chorób umysłowych, kardiologicznych i schorzeń endokrynologicznych [25]. W związku z tym białkowe kinazy tyrozynowe są atrakcyjnym obiektem badań przy poszukiwaniu czynników terapeutycznych przeciwko nowotworom i innym schorzeniom. Zagadnienia te stały się tematem dwóch kolejnych międzynarodowych konferencji organizowanych w Warszawie przez prof. Davida Sugara (*Inhibitors of Protein Kinases*, 1998 i 2001). Materiały z tych konferencji opublikowano w „*Pharmacology & Therapeutics*” oraz „*Cellular & Molecular Biology Letters*”.

Obecnie prowadzone są intensywne badania dotyczące zastosowania farmakologicznego inhibitorów kinaz tyrozynowych. W ciągu ostatnich pięciu lat utworzono nową klasę strukturalnych inhibitorów kinazy tyrozynowej EGFR. Charakteryzują się one wysoką skutecznością, specyficznością i aktywnością *in vitro* i *in vivo*, a jednocześnie relatywnie małą toksycznością dla pacjentów [26].

Wyróżnia się dwa rodzaje inhibitorów stosowane w terapii nowotworów: inhibitory wiążące się do miejsca wiązania ATP w domenie katalitycznej kinaz (np. genisteiny) i inhibitory hamujące aktywność kinaz tyrozynowych poprzez wiązanie się do miejsca wiązania substratu (np. tyrphostyny).

Większość inhibitorów nowej generacji działa na zasadzie współzawodnictwa z ATP w miejscu aktywnym kinazy tyrozynowej. Należą do nich głównie inhibitory dla receptorów: EGFR, PDGFR, FGFR oraz dla Src [27]. Inhibitory te wiążą się do wysoko konserwowanej sekwencji w „kieszce” wiążącej nukleotydy w domenie katalitycznej. Specyficzne inhibitory kinaz wykorzystują pewną zmienność sekwencji wokół miejsca wiązania ATP, jak i różnice konformacyjne między formą aktywną i nieaktywną kinazy [28].

Ostatnio odkryto klasę inhibitorów o dużym powinowactwie, które bardzo selektywnie i nieodwracalnie inaktywują kinazę tyrozynową EGFR poprzez specyficzną, kowalencyjną modyfikację cysteiny w miejscu wiążącym ATP. Istnieją dowody, że związki te oddziałują w analogiczny sposób z erb B-2, ale

nie wpływają na inne kinazy tyrozynowe zarówno receptorowe, jak i cytozolowe [29].

Inną grupą inhibitorów kinaz są tyrphostyny, które działają m. in. na: Jak2, Src, p210<sup>Bcr-Abl</sup>, IGF-1R, EGFR, PDGFR. Ponieważ wymienione kinazy indukują szlaki sygnałowe powstała koncepcja „terapii transdukcji sygnałowej” stosowanej w chorobach i stanach zapalnych takich jak: rak, łuszczyca, posocznica czy stwardnienie rozsiane [30].

W ciągu ostatnich kilku lat odkryto wiele, łatwo wnikających do komórek inhibitorów kinaz białkowych, które wykazują relatywnie dużą specyficzność do poszczególnych kinaz. Są wykorzystywane do identyfikacji fizjologicznych substratów kinaz, jak i badania funkcji komórkowej tych kinaz [31].

Jedynym mechanizmem hamującym wzrost i rozprzestrzenianie się raka jest w przypadku wielu rodzajów nowotworów, zahamowanie tworzenia się naczyń krwionośnych, w tym także naczynek włosowatych, co jest ważne w procesie proliferacji komórek rakowych. Na tej zasadzie działa na przykład inhibitor PTK 787/ZK 222584, będący specyficznym inhibitorem kinazy VEGFR [32].

Wyjątkowo wysokie powinowactwo i specyficzność do niektórych kinaz tyrozynowych wykazano dla serii inhibitorów będących pochodnymi 2-fenylaminopirymidyn. Najbardziej obiecujący spośród nich wydaje się STI-571. Posiada on wysokie powinowactwo do niereceptorowej kinazy tyrozynowej Abl, natomiast nie wpływa na aktywność kinaz serynowo/treoninowych i większości receptorowych kinaz tyrozynowych (oprócz dwóch kinaz receptorowych — PDGF i c-kit). W testach klinicznych wykazano skuteczność inhibitora STI-571 w leczeniu rozległej białaczki szpiku kostnego, której towarzyszy wzmożona aktywacja kinazy Abl przy jednocześnie niewielkich skutkach ubocznych [33]. Inhibitor ten rozpoznaje i wiąże się do kinazy będącej w nieaktywnej konformacji, w której miejsce aktywacyjne (Tyr<sup>393</sup>) nie jest ufosforylowane, utrzymując enzym w stanie nieaktywnym. Na podstawie powyższych wyników zasugerowano, że związki chemiczne, które wykorzystują indywidualne mechanizmy inaktywacji dla konkretnych kinaz białkowych wykazują zarówno wyższe powinowactwo, jak i wyższą specyficzność [29].

## VII. Uwagi końcowe

Białkowe kinazy tyrozynowe pełnią kluczową rolę w prawidłowym funkcjonowaniu komórek zwierzęcych.

Różnorodność budowy receptorowych kinaz tyrozynowych zapewnia selektywne i sprawne przekazywanie sygnałów czynników wzrostu.

Niereceptorowe kinazy tyrozynowe dzięki obecności domen SH2, SH3 i PH mają zdolność do wiązania różnych białek. Są to białka adaptorowe, zakotwiczone, strukturalne i enzymatyczne. Wskazuje to na ich szerokie wykorzystanie w procesach przekazywania sygnału, a tym samym podobnie jak w przypadku kinaz receptorowych w procesach wzrostu, rozwoju i różnicowania komórek.

Zaburzenia w szlakach przekazywania sygnałów mogą prowadzić do transformacji nowotworowej - tak jak dzieje się w przypadku mutacji proto-onkogenów kodujących kinazy tyrozynowe, co prowadzi do różnego typu białaczek. Oprócz mutacji, onkogenna aktywacja kinaz tyrozynowych może zachodzić poprzez anormalną ekspresję lub nadekspresję typowej kinazy tyrozynowej lub też nadekspresję ligandu skutkując różnymi formami nowotworów.

Ze względu na udział kinaz tyrozynowych w procesach transformacji nowotworowej wydaje się być pożądanym poszukiwanie nowych, specyficznych inhibitorów tych enzymów o znaczeniu klinicznym a także dalsze badanie budowy i funkcji enzymów odpowiedzialnych za fosforylację białek.

*Artykuł otrzymano 11 października 2001*

*Zaakceptowano do druku 2 stycznia 2002*

## Piśmiennictwo

- Hunter T (1998) The Croonian Lecture (1997) *Phil Trans R Soc Lond B* 353: 583-605
- Czarny M, Poddana H, Barańska J (1992) *Post Biochem* 38: 107-112
- Barańska J (1998) *Post Biochem* 44: 201-208
- Kamińska-Kaczmarek B (1995) w: Konarska L (red) *Molekularne mechanizmy przekazywania sygnałów w komórce*, Warszawa, PWN, str 62-76
- Yarden Y, Ullrich A (1988) *Ann Rev Biochem* 57: 443-478
- van der Geer P, Hunter T, Lindberg R A (1994) *Ann Rev Cell Biol* 10: 251-337
- Ullrich A, Schlessinger J (1990) *Cell* 61: 203-212
- Bolen J B (1993) *Oncogene* 8: 2025-2031
- Kralisz U (1994) *Post Biochem* 40: 40-45
- Koch C A, Anderson D, Moran M F, Ellis C, Pawson T. (1991) *Science* 252: 668-674
- Sicheri F, Kuriyan J (1997) *Curr Op Struct Biol* 7: 777-785
- Songyang Z i wsp (1993) *Cell* 72: 767-778
- Pawson T (1995) *Nature* 373: 573-580
- Schlessinger J (1993) *TIBS* 18: 273-275
- Niewiadomska G, Małecki M (1999) *Post. Biochem* 45: 21-31
- Darnell J E, Kerr J M, Stark G R (1994) *Science* 264: 1415-1421
- Webster M K, Donoghue D J (1997) *Trends Genet* 13: 178-182
- Sato T N i wsp (1995) *Nature* 376: 70-74
- Shalaby F i wsp (1997) *Cell* 89: 981-990
- Baron R, Amling M, Tanaka S, Levy J Eighth International Symposium on Cytoplasmic Protein - Tyrosine Kinases, Stockholm 1997
- Ekman N, Väström J, Sarvas K, Kaipainen A, Lymboussaki A, Saharinen P, Parker P, Silvennoinen O, Alitalo K (1997) Eighth International Symposium on Cytoplasmic Protein-Tyrosine Kinases, Stockholm 1997
- Mc Cormick F (1999) *TIBS* 24: M53-M56
- Kolibaba K S, Druker B J (1997) *Biochem Biophys Acta* 1333: F217-F248
- Porter A C, Vaillancourt R R (1998) *Oncogene* 16: 1343-1352
- Levitzki A, Gazit A (1995) *Science* 267: 1782-1788
- Traxler P, Furet P (1999) *Pharmacol Ther* 82: 195-206
- Fry D W (1999) *Pharmacol Ther* 82: 207-218
- Schindler T i wsp (2000) *Science* 289: 1938-1942
- Fry D W i wsp. (1998) *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 12022-12027
- Levitzki A (1999) *Pharmacol Ther* 82: 231-239
- Davies S P, Reddy H, Caivano M, Cohen P (2000) *Biochem J* 351: 95-105
- Dreves J i wsp (2000) *Cancer Res* 60: 4819-4824
- Fabbro D (2001) *Cellular & Molecular Biology Letters* 6 nr 2B: 459-461

# Roślinne kinazy białkowe fosforylujące tyrozyne

## Plant protein kinases phosphorylating tyrosine

MARIA KLIMECKA<sup>1</sup>, JOANNA TROJANEK<sup>2</sup>, GRAŻYNA MUSZYŃSKA<sup>3</sup>

### Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Fosforylacja tyrozyny w białkach roślinnych
- III. Kinazy MAPK
- IV. Rodzina kinaz LAMMER
- V. Udział kinaz o podwójnej specyficzności w przekazywaniu sygnałów stresu
- VI. Kinazy fosforylujące tyrozyne w białkach drożdży
- VII. Uwagi końcowe

### Contents:

- I. Introduction
- II. Tyrosine phosphorylation in plant protein
- III. MAPK kinases
- IV. LAMMER kinases family
- V. Role of dual-specificity protein kinases in stress signal transduction
- VI. Tyrosine phosphorylating kinases in yeast proteins
- VII. Concluding remarks

**Wykaz stosowanych skrótów:** CDC — kinaza zależna od cyklin (ang. *Cyclin Dependent Kinase*); CTR1 — kinaza serynowo-treoninowa (ang. *Constitutive Triple Response*); DSK — kinaza białkowa o podwójnej specyficzności (ang. *Dual Specificity Kinase*); EIN2 — białko receptorowe błony jądrowej niewrażliwe na etylen (ang. *Ethylene Insensitive*); EREBP (ang. *Ethylene Response Element Binding Protein*); ERS (ang. *Ethylene Response Sensor*); ETR — receptor etylenu (ang. *Ethylene Receptor*); MAPK — kinaza MAP (ang. *Mitogen Activated Protein Kinase*); MBP — białko zasadowe mieliny (ang. *Myelin Basic Protein*); MEK — kinaza fosforylująca i aktywująca ERK (ang. *Mitogen/Extracellular Signal Regulated Kinase Kinase*); MKK — kinaza kinazy MAP (ang. *MAP Kinase Kinase*); MKKK — kinaza kinazy kinazy MAP (ang. *MAP Kinase Kinase Kinase*).

### I. Wstęp

Badania fosforylacji białek u roślin są znacznie mniej zaawansowane aniżeli u zwierząt, dlatego też początkowo poszukiwano u roślin kinaz tyrozynowych podobnych do znanych kinaz ze świata zwierzęcego. Ostatnie lata dostarczyły jednakże danych molekularnych wykluczających obecność u roślin typowych kinaz tyrozynowych.

Jednocześnie wykazano, że zawartość fosfotyrozyny w białkach komórek tytoniu i kukurydzy jest

ponad 10-krotnie wyższa [1, 2] od ilości występującej normalnie w komórkach zwierzęcych i porównywalna z ilością fosfotyrozyny w komórkach zwierzęcych transformowanych nowotworowo [3]. Fakt ten świadczy o obecności w roślinach swoistych kinaz białkowych fosforylujących tyrozyne. Niniejszy artykuł przedstawia aktualne wyniki badań dotyczące tego problemu.

### II. Fosforylacja tyrozyny w białkach roślinnych

Badania wpływu fosforylacji tyrozyny na rozwój embrionów kokosa (*Cocos nucifera L.*) wykazały w znakowanych [<sup>32</sup>P] hydrolizatach białkowych obecność wszystkich trzech fosfoaminokwasów: P-Tyr, P-Thr i P-Ser. Aktywność kinazy fosforylującej reszty tyrozyny identyfikowano przy użyciu przeciwciał monoklonalnych anty-P-Tyr oraz na podstawie fosforylacji substratu RR-Src (fragment peptydu kinazy tyrozynowej Src). Stwierdzono zmienny poziom aktywności w zależności od stadium rozwojowego zarodków [4].

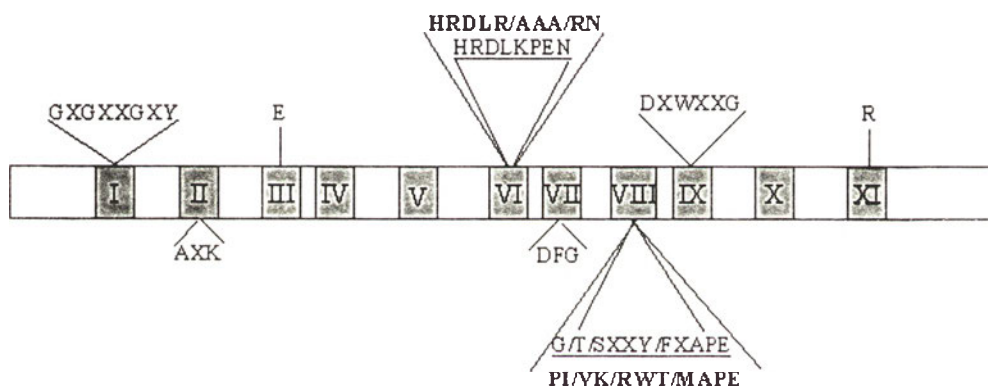
Materiałem do badań nad identyfikacją aktywności kinaz fosforylujących tyrozyne były również korzenie *Catharantus roseus* transformowane DNA bakterii azotanowej (*Agrobacterium rhizogenes*) [5]. Badano ekstrakty komórkowe frakcji cytosolowej i błonowej. Stwierdzono obecność kilku ufosforylowanych białek, opornych na działanie hydrolizy al-

<sup>1</sup>Mgr, <sup>2</sup>dr, <sup>3</sup>prof. dr hab.; Instytut Biochemii i Biofizyki PAN, Pańskiego 5a, 02-106 Warszawa, tel. 658 47 06, e-mail: muszynsk@ibb.waw.pl

kalicznej, co świadczyło o obecności w tych białkach fosforylowanych reszt tyrozynowych i treoninowych. Białka te reagowały z przeciwciałami skierowanymi przeciwko fosfotyrozynie.

Interesujące badania przeprowadzono ostatnio na fasoli (*Phaseolus vulgaris*), badając fosforylację profiliny [6]. Profiliny są małymi białkami ~15kD, występującymi powszechnie w komórkach eukariotycznych, będącymi ważnym alergenem pyłkowym u roślin [7]. Stwierdzono wpływ profiliny na polimeryzację aktyny podczas tworzenia filamentów w cytoszkieletcie [8]. Wydaje się, że profilina wpływa także na metabolizm fosfoinozytoli i pełni ważną funkcję w przekazywaniu sygnałów zarówno u zwierząt i drożdży, jak i u roślin. Zastosowanie metod elektroforezy dwukierunkowej i immunodetekcji pozwoliło na identyfikację w brodawkach korzeniowych fasoli

ślin. Z opisanych prac wynika, że w białkach roślinnych zachodzi fosforylacja reszt tyrozyny i fosforylowane są także substraty egzogenne, jak np. polimery syntetyczne zawierające tyrozynę (poli Glu, Tyr) oraz RR-Src. Jednakże wyniki większości badań wskazują, że w białkach endogennych, jak i wielu egzogennych fosforylowane są wszystkie trzy aminokwasy, a nie wyłącznie tyrozyna. Pierwsze doniesienia o występowaniu kinaz o podwójnej specyficzności DSKs (ang. *Dual-Specificity Protein Kinases*) pochodzą z 1992r. [10]. Doniesienia te wzbudziły początkowo wiele wątpliwości wśród badaczy kinaz białkowych. Dopiero badania molekularne wykazujące, że enzymy te cechuje mozaikowa struktura sekwencji zawierająca zarówno motywy charakterystyczne dla kinaz serynowo-treoninowych, jak i tyrozynowych (Ryc. 1) pozwoliły na zdefiniowanie tej



Ryc. 1. Budowa typowej domeny katalitycznej kinazy. (Schemat wg. Stone i Walker, 1995 [12], modyfikowany). Czcionką pogrubioną zaznaczono sekwencje charakterystyczne dla kinaz tyrozynowych, natomiast sekwencje podkreślone są charakterystyczne dla kinaz serynowo-treoninowych.

pięciu izoform profiliny. Chromatografia cienkowarstwowa i użycie roślinnej fosfatazy tyrozynowej (AtPTP1) wykazały obecność w profilinie ufosforylowanej tyrozyny. Można przypuszczać, że profilina jest jednym z fizjologicznych substratów dla kinaz fosforylujących tyrozynę [6].

Z cytosolu siewek kukurydzy wyizolowano i częściowo oczyszczono dwie kinazy białkowe fosforylujące tyrozynę, o masach cząsteczkowych 57 kD i 64 kD. Kinaza o m. cz. 57 kD ulega silnej autofosforylacji. Zarówno w endogennych białkach o masie cząsteczkowej 57 kD i 64 kD, jak i w substracie egzogennym (kazeinie), fosforylowane są: tyrozyna i seryna. Kinazy te wykazują szeroką specyficzność substratową, fosforylując zarówno substraty kinaz tyrozynowych, jak też substraty kinaz serynowo-treoninowych [9].

Powyżej przedstawiono dotychczasowe wyniki biochemicznych badań fosforylacji tyrozyny u ro-

grupy enzymów. I tak np. kinaza z soi GmPK6 ma budowę mozaikową i posiada sekwencje charakterystyczne zarówno dla kinaz serynowo-treoninowych jak i tyrozynowych [11].

Innym przykładem kinaz o mozaikowej sekwencji może być kinaza APK1 (ang. *Arabidopsis Protein Kinase 1*). Analiza sekwencji tej kinazy wykazała, że rejony VI i VIII domeny katalitycznej są charakterystyczne dla kinaz serynowo-treoninowych, natomiast rejon IX wykazuje homologię do kinaz tyrozynowych. Stwierdzono, że białko ekspresyjne tej kinazy fosforyluje reszty seryny i treoniny zarówno w białkach endogennych, jak i egzogennych. Jednocześnie jednak kinaza ta reaguje z przeciwciałami skierowanymi przeciwko fosfotyrozynie. Wydaje się więc, że APK1 jest kinazą o podwójnej specyficzności, która fosforyluje reszty wszystkich trzech aminokwasów, przy czym resztę tyrozyny w ograniczonym zakresie, tylko podczas autofosforylacji [13].

Kolejnym przykładem może być kinaza ADK1 (ang. *Arabidopsis Dual-Specificity Kinase 1*). Otrzymana po ekspresji kinaza ADK1 autofosforyluje reszty seryny, treoniny i tyrozyny. Ponadto, w doświadczeniach *in vitro* kinaza ta fosforylowała reszty tyrozyny w egzogennym substracie poli Glu, Tyr. Podobnie jak APK1, ADK1 posiada sekwencje podobne zarówno do kinaz serynowo-treoninowych (wysoka homologia do CKI zwierzęcej i drożdżowej), jak i kinaz tyrozynowych [14].

Do grupy kinaz o podwójnej specyficzności można zaliczyć także kinazę kodowaną przez gen ATN1 z *Arabidopsis* [15]. Kinaza ATN1 posiada także strukturę mozaikową oraz na N-końcu sekwencję charakterystyczną dla mirystylacji.

Powyżej wymienione kinazy cechuje zdolność do autofosforylacji reszt seryny, treoniny i tyrozyny oraz w różnym stopniu fosforylacji tych reszt aminokwasowych w substratach egzogennych. Wyniki tych badań sugerują, że poznane dotychczas roślinne kinazy fosforylujące tyrozinę są kinazami o podwójnej specyficzności.

### III. Kinazy MAPK

Kinazy o podwójnej specyficzności uczestniczą w kilku głównych szlakach przekazywania sygnałów w komórce zwierzęcej, co opisano uprzednio m. in. w „*Postęпах Biochemii*” [16-18]. W każdym ze szlaków przekazywania sygnałów, zwanych kaskadą kinaz MAP obecna jest kinaza określana jako MAPKK (ang. *Mitogen Activated Protein Kinase Kinase*) lub MEK (ang. *Mitogen/Extracellular-Signal Regulated Kinase Kinase*). MAPKK/MKK/MEK jest kinazą o podwójnej specyficzności, ponieważ katalizuje fosforylację reszt treoniny i tyrozyny w sekwencji TXY w cząsteczce MAPK. Taki schemat przekazywania sygnałów jest ewolucyjnie zachowywany w komórkach eukariotycznych [19].

Seqwencja TEY była pierwszą poznaną i początkowo uważaną za jedyną sekwencję rozpoznawaną w procesie fosforylacji, przez kinazy o podwójnej specyficzności [20]. Obecnie znanych jest kilka motywów sekwencyjnych rozpoznawanych przez grupę kinaz MKK/MEK. W zależności od tego, czy MKK fosforyluje kinazy ERK, JNK (ang. *c-Jun N-terminal Kinase*) /SAPK (ang. *Stress Activated Protein Kinase*) czy też p38, motywem sekwencyjnym, w którym znajdują się reszty tyrozyny lub treoniny jest: TEY, TPY lub TGY, odpowiednio [21].

Kinazy z rodziny MKK/MEK pełnią również istotną rolę we właściwej lokalizacji i organizacji kaskady kinaz MAP. Ostatnio stwierdzono, że przeka-

zywanie sygnałów szlakiem kinaz MAP zarówno u ssaków, jak i u drożdży (*Saccharomyces cerevisiae*) regulowane jest przez białka tworzące „rusztowanie” dla wieloenzymowych kompleksów (ang. *scaffold proteins*). Białka te ułatwiają aktywację szlaku MAPK oraz zapewniają specyficzność sygnałową poprzez ochronę kinaz MAP przed działaniem niespecyficznego bodźca [22].

Kinazy o podwójnej specyficzności uczestniczą w kaskadach kinaz MAP także u roślin. U *Arabidopsis* zidentyfikowano kinazy kinaz MAP (ATMEK1, ATMKK2, ATMKK3, ATMKK4, ATMKK5) fosforylujące tyrozinę i treoninę w charakterystycznej sekwencji TEY w regionie VIII domeny katalitycznej we wszystkich roślinnych kinazach MAP. Kinazy kinaz MAP wyizolowano także z innych roślin, np. z pomidora (TMEK1), z tytoniu (NPK2) i z kukurydzy (ZmMEK1) [23, 24]. Obecność tych enzymów świadczy o istnieniu w roślinach kaskady kinaz MAP.

Z biblioteki ekspresyjnej wierzchołków korzeniowych kukurydzy wyizolowano klon cDNA ZmMEK1. ZmMEK1 zawiera „otwartą ramkę odczytu” kodującą białko o długości 355 aminokwasów i oszacowanej masie cząsteczkowej ~40 kD. Jest to kinaza kinazy MAP aktywowana przez stres lub mitogeny M/SAPKK (ang. *Mitogen/Stress-Activated Protein Kinase Kinase*). Do tej rodziny zaliczamy również inne kinazy o podwójnej specyficzności, których jedynymi substratami *in vivo* są M/SAPK. Do tej pory wyizolowano sześć homologów genów M/SAPKK z *Arabidopsis*, jeden z tytoniu i jeden z ziemniaka. Domena katalityczna ZmMEK1 jest podobna w 65% do homologicznego genu z tytoniu (LeMEK1) i wykazuje także podobieństwo (39-60%) do domen M/SAPKK innych roślin oraz zwierząt i grzybów [25].

U *Arabidopsis thaliana* zidentyfikowano kilka kinaz MAP — substratów MEK/MKK, które wykazują dużą homologię do kinaz zwierzęcych i drożdżowych [26]. Kinazy te zostały początkowo sklasyfikowane w trzy grupy: 1) ATMPK1, 2 i 7; 2) ATMPK3 i 6; 3) ATMPK4 i 5, a później zidentyfikowano dodatkowo grupę 4) ATMPK8 i 9 [27]. Podobieństwo aminokwasowe wewnątrz poszczególnych grup wynosiło od 75% do 94%, natomiast pomiędzy grupami wahało się w granicach od 53% do 72%.

### IV. Rodzina kinaz LAMMER

Kilka lat temu opisano nową rodzinę kinaz o podwójnej specyficzności tzw. rodzinę LAMMER. Kinazy tej rodziny autofosforylują się na resztach sery-

ny, treoniny i tyrozyny zarówno *in vitro* jak i *in vivo* oraz posiadają konserwatywny motyw EHLAMMERI/VLGPLP w rejonie X domeny katalitycznej, który jak początkowo przypuszczano może uczestniczyć w rozpoznawaniu substratu. Do tej rodziny należy ssacza kinaza Clk/STY, kinaza DOA z *Drosophila*, ludzka SK-G1, KNS1 u *Saccharomyces cerevisiae* oraz kilka innych kinaz eukariotycznych. Kinazy te są spokrewnione z rodziną kinaz MAP, ale posiadają inną specyficzność substratową *in vivo*. Wykazują także podobieństwo do kinaz zależnych od cyklin typu CDC-2. Pomimo, że ich funkcja fizjologiczna nie została jeszcze wystarczająco poznana, wiadomo, że kinazy LAMMER uczestniczą w fosforylacji i regulacji czynników alternatywnego składania RNA (ang. *splicing*) bogatych w serynę/argininę (SR). Sugeruje się także, że kinazy te mogą pełnić rolę w regulacji wzrostu i różnicowania komórek [28, 29].

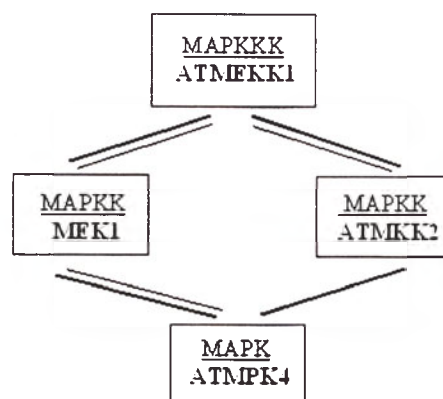
Roślinną kinazą należącą do rodziny LAMMER jest kinaza PK12. Została ona zlokalizowana w jądrze komórek tytoniu. Kinaza PK12, podobnie jak zwierzęce kinazy LAMMER fosforyluje czynniki alternatywnego składania RNA bogate w serynę/argininę (SR) *in vitro* i zmienia ich aktywność powodując alternatywne składanie docelowych mRNA. PK12 z tytoniu fosforylowała zarówno zwierzęce, jak i roślinne białka SR oraz specyficznie oddziaływała z roślinnym czynnikiem atSRp34/SR1. Wykazano ponadto, że sekwencja LAMMER jest wymagana dla aktywności tej kinazy, ale nie jest konieczna dla rozpoznawania i wiązania substratu. Kinaza PK12 jest pierwszą roślinną kinazą, która fosforyluje i oddziałyduje z czynnikami SR [30].

## V. Udział kinaz o podwójnej specyficzności w przekazywaniu sygnałów stresu

Rośliny, które są szczególnie narażone na różnorodne czynniki środowiskowe były zmuszone wykształcić wiele mechanizmów obronnych i dlatego są interesującym obiektem do badań nad przekazywaniem sygnałów.

Do zbadania obecności kaskady kinaz MAP u *Arabidopsis* posłużono się dwiema technikami molekularnymi: dwuhybrydowym screeningiem białek oddziaływujących z poznanym wcześniej ATMEKK1 (MAPKKK) oraz analizą fizycznych i funkcjonalnych oddziaływań pomiędzy izolowanymi z *Arabidopsis* homologami MAPK, MAPKK i MAPKKK za pomocą komplementacji mutantów drożdżowych. Wyizolowano zarówno homolog MAPKK — ATMKK2, jak i homolog MAPK —

ATMPK4. ATMKK2 wykazuje duże podobieństwo sekwencyjne do MEK1 (MAPKK) z *Arabidopsis*. Zaproponowano także schemat ewentualnej kaskady kinaz MAP: ATMEKK1 (homolog MAPKKK) od-



Ryc. 2. Hipotetyczny model kaskady kinaz MAP u *Arabidopsis th.* (Schemat wg. Ichimura K. i wsp., 1998 [27], modyfikowany). Liniami zaznaczono oddziaływania pomiędzy kinazami badane poprzez system dwuhybrydowy (linie pogrubione) i komplementację mutantów drożdżowych (linie cienkie).

działywa z MEK1 i ATMKK2 (homologi MAPKK), które to przekazują sygnał do ATMPK4 (homolog MAPK) [27] (Ryc. 2).

Roślinne kaskady kinaz MAP odgrywają ważną rolę w podziałach komórkowych i odpowiedzi na stres, na przykład w przekazywaniu sygnałów wywołanych przez takie czynniki jak: patogeny, stres abiotyczny oraz hormony roślinne tj. kwas abscysynowy (ABA), auksynę lub etylen [31]. ABA wywołuje sygnał hormonalny w sposób tkankowo-specyficzny, aktywując kaskadę kinaz MAP w protoplastach warstwy aleuronowej jęczmienia [32]. Również mechaniczne uszkodzenia powodują natychmiastową indukcję i aktywację kinaz MAP u roślin jedno- i dwuliściennych. U lucerny (*Alfa alfa*) stymulacja mechaniczna, zranienie, stresy zimna i suszy powodują szybką, natychmiastową aktywację kinaz MAP, a w konsekwencji aktywację transkrypcji odpowiednich genów [33]. Kaskada kinaz MAP aktywowana jest także podczas stresu osmotycznego zarówno w komórkach tytoniu [34], jak i u *Arabidopsis* [35].

Z komórek lucerny poddanych hiperosmotycznemu stresowi solnemu wyizolowano kinazę SIMK (SIMKK, ang. *Salt Stress-Induced MAPKK*), która fosforyluje *in vitro* i *in vivo* reszty treoniny i tyrozyny w miejscu katalitycznym kinazy MAP nazywanej SIMK. Świadczy to, że SIMKK jest, podobnie jak inne kinazy MAPK, kinazą o podwójnej specyficzności [24].

Wynika z tego, że kaskada kinaz MAP jest mechanizmem przekazywania sygnałów, wspólnym u wszystkich Eukariota. Aktywacja tej kaskady, wywoływana przez różne czynniki, stymuluje specyficzną odpowiedź fizjologiczną.

Niedawno wykazano, że  $H_2O_2$  jest centralną cząsteczką sygnałową w odpowiedzi na stres, zranienie i atak patogenu, w regulacji cyklu życiowego i śmierci komórki. Ale niewiele dotychczas wiadomo, w jaki sposób sygnał  $H_2O_2$  jest przekazywany w komórkach roślinnych. Wykazano, że kinaza MAPKKK z *Arabidopsis* — ANP1 (ang. *Arabidopsis NPK1-like Protein Kinase*, gdzie NPK jest kinazą białkową tytoniu ang. *Nicotiana Protein Kinase*) może być indukowana przez  $H_2O_2$  i aktywuje specyficzną klasę kinaz MAPK — AtMPK3 i AtMPK6. AtMPK3 i 6 są podobne do kinaz MAP u tytoniu i lucerny, biorących udział w transdukcji sygnałowej indukowanej przez stres i patogeny. Kaskada kinaz MAP odgrywa rolę w regulacji ekspresji genów: aktywuje geny odpowiedzi na stres, które chronią roślinę przed stresami środowiska i hamuje promotory genów indukowanych przez auksynę. Kaskada kinaz MAP z udziałem ANP1 jest więc molekularnym łącznikiem między stresem oksydacyjnym i roślinnym hormonem wzrostu — auksyną. Białka ANP/NPK1 znaleziono w dużym stężeniu w komórkach merystemów, co może sugerować, że MAPKKK odgrywają rolę w naturalnej odporności merystemów na różnorodne stresy i uczestniczą w regulacji cyklu komórkowego i transdukcji sygnałowej stresu oksydacyjnego u roślin [36].

Mechanizm aktywnej obrony rośliny przed inwazją patogenów obejmuje szybką śmierć komórki, zwaną reakcją nadwrażliwości HR (ang. *Hypersensitive Response*), aktywację puli genów obronnych i produkcję antypatogennych fitoaleksyn. W komórkach tytoniu atak patogenu aktywuje dwie kinazy MAP: kinazę białkową indukowaną przez kwas salicylowy (SIPK, ang. *Salicylic Acid Induced Protein Kinase*) i kinazę indukowaną przy zranieniu (WIPK, ang. *Wounding Induced Protein Kinase*). Zidentyfikowano w tytoniu także kinazę MAPKK — NtMEK2, która aktywując SIPK i WIPK wywołuje śmierć komórki podobną do reakcji HR i aktywację wielu genów, co potwierdzałoby istnienie kaskady NtMEK2 — SIPK/WIPK regulującej obronną odpowiedź rośliny na patogen [37].

Jak dotychczas, najlepiej poznanym, specyficznym dla roślin szlakiem przekazywania sygnałów, w którym sugerowany jest udział kinaz o podwójnej specyficzności jest szlak etylenowy. Synteza etyleny zachodzi zarówno w odpowiedzi na zmiany środowi-

skowe, jak i podczas rozwoju rośliny, tj. podczas patogenez, zranienia, zapylenia, starzenia i więdnienia kwiatów i liści oraz dojrzewania owoców [38].

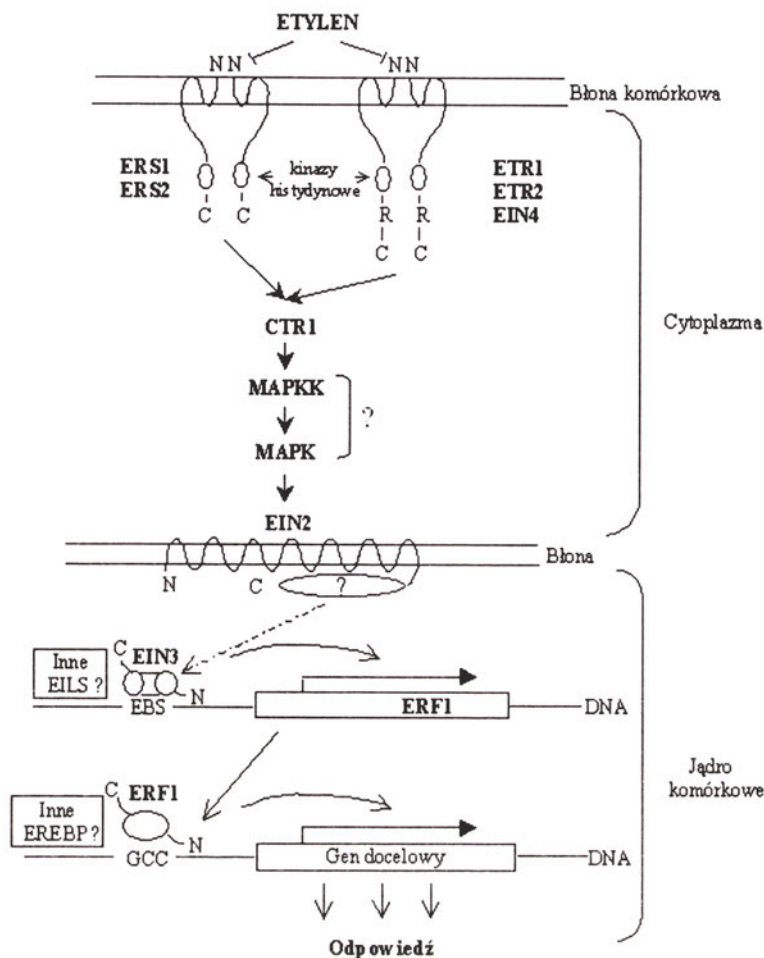
Etylen wiąże się do lipidów błony komórkowej, w których jest około 14-krotnie lepiej rozpuszczalny niż w wodzie. Receptorem etyleny jest białko ETR1 (ang. *Ethylene Receptor1*) zakotwiczone w błonie jako homodimer, które przenosi sygnał używając mechanizmu transferu grupy fosforanowej z reszty histydyny na resztę kwasu asparaginowego [39]. ETR1 posiada hybrydowy rodzaj połączenia cząsteczki “sensora” z białkiem regulatora odpowiedzi”. Zasada działania ETR jako receptora roślinnego została już wcześniej opisana w „*Postęпах Biochemii*” [40].

U *Arabidopsis* zidentyfikowano cztery geny homologiczne do ETR1: ETR2, EIN4, ERS1 i ERS2. Tylko niektóre z nich, tj. ETR1, ETR2 i EIN4 posiadają dwuskładnikową budowę, w przeciwieństwie do ERS1 i ERS2, które nie mają domeny „odbiorcy” i prawdopodobnie posługują się innymi “regulatorami odpowiedzi” [41].

Z ETR1 (lub jego homologów) sygnał jest przekazywany na CTR1. CTR1 jest kinazą serynowo/treoninową, o wysokim podobieństwie do zwierzęcej MAPKKK z rodziny Raf. CTR1 negatywnie reguluje szlak przekazywania sygnału etylenowego przez zahamowanie ekspresji genu EIN2 kodującego białko receptorowe błony jądrowej [42] (Rys. 3). W procesie transdukcji sygnałów pomiędzy CTR1 i EIN2 postuluje się udział całej kaskady kinaz MAP obejmującej obok wspomnianej MAPKKK, także MAPKK i MAPK [39, 43].

Badania genetyczne wykazały, że czynniki: EIN2, EIN3, EIN5 i EIN6 działające „poniżej” CTR1, są pozytywnymi regulatorami odpowiedzi etylenowej. Natomiast nieznany jest, jak dotychczas mechanizm działania na poziomie molekularnym cząsteczek EIN5 i EIN6. [43]. Przy braku etyleny białka receptorowe: ETR1, ETR2, ERS1, ERS2 i EIN4 konstytutywnie aktywują negatywny regulator CTR1, przez co hamują dalsze przekazywanie sygnału. Natomiast związanie etyleny hamuje receptorową aktywację CTR1, prawdopodobnie poprzez inhibicję autofosforylacji histydyny oraz fosfotransferu do domeny regulatora odpowiedzi. Przy braku aktywacji CTR1, integralna domena błonowa białka EIN2 aktywuje swoją C-końcową domenę hydrofilową, która następnie przekazuje sygnał do EIN3. Jądrowe białko EIN3 i jego analogi — białka EILs (ang. *EIN3 Like Proteins*), działające „poniżej” EIN2 posiadają zdolność wiązania DNA. Są one czynnikami transkrypcyjnymi, które wiążąc się do promotorów akty-





Ryc. 3. Szlak przekazywania sygnału etylenowego u *Arabidopsis th.* (Schemat wg. Stepanova i Ecker, 2000 [44], modyfikowany). Skrótów oznaczają: C — C-koniec białka; EBS — miejsce wiązania czynnika EIN3 (ang. *EIN3 Binding Site*); GCC — domena GCC; N — N-koniec białka; R — odbiorca (ang. *Receiver*).

wują geny w odpowiedzi na sygnał etylenowy. U *Arabidopsis* jedynym znanym genem aktywowanym przez EIN3, w odpowiedzi na etylen jest ERF1 (ang. *Ethylene Response Factor 1*), należący do rodziny EREBP. Dimery EIN3 działają na palindromicznie powtórzony fragment promotora ERF1. EREBP są to czynniki transkrypcyjne wiążące DNA w miejscu GCC-box, promotora genów odpowiedzi na etylen, działając jako aktywatory lub represory ich transkrypcji [44, 45].

## VI. Kinazy fosforylujące tyrozinę w białkach drożdży

Na podstawie analizy sekwencji całego genomu drożdży pączkujących (*Saccharomyces cerevisiae*) stwierdzono, że wśród otwartych ramek odczytu w DNA tych organizmów brak jest genów kinaz białkowych homologicznych do genów typowych kinaz tyrozynowych. Nieobecność typowych kinaz tyrozynowych nie oznacza jednak, że brak jest u drożdży

enzymów fosforylujących reszty tyrozyny. Przykładowo, w komórkach drożdży występuje kilka enzymów, fosforylujących tyrozinę. I tak kinaza Swel, należąca do rodziny Wee1, fosforyluje resztę tyrozyny w pozycji 19 w białku Cdc28, które hamuje aktywność CDK. Dwie inne kinazy tej samej rodziny Spk1/Rad53/Mec2/Sad1 i Mps1/Rpk1, które autofosforylują się na resztach seryny, treoniny i tyrozyny są kinazami białkowymi o podwójnej specyficzności. Kinazy Spk1 uczestniczą w regulacji przejścia z fazy S do G2 w cyklu komórkowym, a kinazy Mps1 w tworzeniu biegunów wrzeciona kinetycznego przy podziale komórki. W komórkach drożdży odkryto także kilka fosfataz tyrozynowych, co potwierdza występowanie fosforylacji reszt tyrozyny u tych organizmów [46].

Innymi kinazami o podwójnej specyficzności w komórkach grzybów są 4 izoformy kinazy CKI-Hrr25p u *Saccharomyces cerevisiae* oraz Hhp1,

Hhp2 i Cki1 u *Schizosaccharomyces pombe*. Wszystkie te kinazy zdolne są do fosforylacji grup hydroksylowych seryny, treoniny i tyrozyny zarówno w substratach endogennych, jak i egzogennych. Wyjątkiem jest tylko kinaza Cki, która może autofosforylować wyłącznie resztę tyrozyny. Izoformy CKI są bliższe ewolucyjnie kinazom serynowo/treoninowym niż tyrozinowym, lecz u obu gatunków drożdży posiadają aktywność kinaz o podwójnej specyficzności [47].

Kinazy o podwójnej specyficzności zaangażowane są także w kaskadę kinaz MAP u *S. cerevisiae*. Biorą one udział w szlaku sygnalizacji feromonów, szlaku inwazyjnego pseudonitkowatego wzrostu, szlaku zapewniającym integralność ściany komórkowej i szlaku osmoregulacji [48].

## VII. Uwagi końcowe

W roślinach brak jest typowych kinaz tyrozynowych będących odpowiednikiem kinaz zwierzęcych.

Za fosforylację tyrozyny w białkach roślinnych odpowiedzialne są kinazy białkowe o podwójnej specyficzności, fosforylujące nie tylko reszty tyrozyny, lecz również seryny lub/i treoniny.

Zwierzęce i drożdżowe DSKs występują przede wszystkim w kaskadach kinaz MAP, natomiast roślinne kinazy tworzą bardziej zróżnicowaną grupę enzymów. Rola biologiczna wielu roślinnych DSK jest jak dotychczas nieznana.

Najlepiej dotychczas poznana jest rola roślinnych MEK w przekazywaniu sygnałów stresu.

Artykuł otrzymano 11 października 2001

Zaakceptowano do druku 2 stycznia 2002

## Piśmiennictwo

- Elliott D C, Geytenbeeck M (1985) *Biochim Biophys Acta* **845**: 317-323
- Trojanek J, Ek P, Scoble J, Muszyńska G, Engström L (1996) *Eur J Biochem* **235**: 338-344
- Cooper J A, Sefton B M, Hunter T (1983) *Methods Enzymol* **99**: 387-402
- Islas-Flores J, Oropeza C, Hernandez-Sotomayor S M T (1998) *Plant Physiol* **118**: 257-263
- Rodriguez-Zapata L C, Hernandez-Sotomayor S M T (1998) *Planta* **204**: 70-77
- Guillen G, Valdes-Lopes V, Noquez R, Olvares J, Rodriguez-Zapata L C, Perez H, Vidali L, Villanueva M A, Sanchez F (1999) *Plant J* **19**: 497-508
- Valenta R, Ferreira F, Grote M (1993) *J Biol Chem* **268**: 22777-22781
- Schlüter K, Jockusch B M, Rothkegel M (1997) *Biochim Biophys Acta* **1395**: 97-109
- Trojanek J, Klimecka M, Fraser A, Dobrowolska G, Muszyńska G, wysłano do druku
- Lindberg R A, Quinn A M, Hunter T (1992) *TIBS* **17**: 114-119
- Feng X H, Zhao Y, Bottino P J, Kung S (1993) *Biochim Biophys Acta* **1172**: 200-204
- Stone J M, Walker J C (1995) *Plant Physiol* **108**: 451-457
- Hirayama T, Oka A (1992) *Plant Mol Biol* **20**: 653-662
- Ali N, Halfter U, Ghua N H (1994) *J Biol Chem* **269**: 31626-31629
- Tregear J W i wsp (1996) *Plant Sci* **117**: 107-119
- Kamińska-Kaczmarek B (1995) w Konarska L (red) *Molekularne mechanizmy przekazywania sygnałów w komórce*, Warszawa, PWN, str 62-76
- Biedermann I W (1996) *Post Biochem* **42**, 244-252
- Niewiadomska G, Małecki M (1999) *Post Biochem* **45**: 21-31
- Dhanasekaran N, Reddy E P (1998) *Oncogene* **17**: 1447-1455
- Nishida E, Gotoh Y (1993) *TIBS* **18**: 128-131
- Cano E and Mahadevan L C (1995) *TIBS* **20**: 117-122
- Whitmarsh A J, Davis R J (1998) *TIBS* **23**: 481-485
- Morris P C, Guerrier, Leung J, Giraudat J (1997) *Plant Mol Biol* **35**: 1057-1064
- Kiegeri S i wsp (2000) *Plant Cell* **12**: 2247-2258
- Hardin S C, Wolniak S M (1998) *Planta* **206**: 577-584
- Mizoguchi T, Hayashida N, Yamaguchi-Schinozaki K, Kamada H, Shinozaki K (1993) *FEBS Lett* **336**: 440-444
- Ichimura K, Mizoguchi T, Irie K, Morris P, Giraudat J, Matsumoto K, Shinozaki K (1998) *Biochem Biophys Res Comm* **253**: 532-543
- Lee K, Du C, Horn M, Rabinow L (1996) *J Biol Chem* **271**: 27299-27303
- Duncan P i wsp (1995) *J Biol Chem* **270**: 21524-21531
- Savaldi-Goldstein S, Sessa G, Fluhr R (2000) *Plant J* **21**: 91-96
- Hirt H (1997) *Trends Plant Sci* **2**: 11-15
- Knetsch M L M, Wang M, Snaar-Jagalska B E, Heimovaara-Dijkstra S (1996) *Plant Cell* **8**: 1061-1067
- Bögre L, Ligterink W, Meskicne I, Barker P J, Heberle-Bors E, Huskisson N S, Hirt H (1997) *Plant Cell* **9**: 75-83
- Mikołajczyk M, Awotunde O S, Muszyńska G, Klessig D F, Dobrowolska G (2000) *Plant Cell* **12**: 165-178
- Mizoguchi T, Irie K, Hirayama T, Hayashida N, Yamaguchi-Schinozaki K, Matsumoto K, Shinozaki K (1996) *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 765-769
- Kovtun Y, Chiu W-L, Tena G, Sheen J (2000) *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 2940-2945
- Yang K-Y, Liu Y, Zhang S (2001) *Proc Natl Acad Sci USA* **98**: 741-746
- Fluhr R (1998) *Trends Plant Sci* **3**: 141-146
- Chang C, Steward R C (1998) *Plant Physiol* **117**: 723-731
- Barańska J (1998) *Post Biochem* **44**: 201-208
- Hua H, Meyerowitz E M (1998) *Cell* **94**: 261-271
- Ecker J (1995) *Science* **268**: 667-675
- Solano R, Ecker J R (1998) *Curr Op Plant Biol* **1**: 393-398
- Stepanova A N, Ecker J R (2000) *Curr Op Plant Biol* **3**: 353-360
- Chang C, Shockey J A (1999) *Curr Op Plant Biol* **2**: 352-358
- Hunter T, Plowman G (1997) *TIBS* **22**: 18-22
- Hoekstra M F, Dhillon N, Carmel G, DeMaggio A J, Lindberg R A, Hunter T, Kuret J (1994) *Mol Biol Cell* **5**: 877-886
- Posas F, Takekawa M, Saito H (1998) *Curr Op Microbiol* **1**: 175-182

# Oksydazy polifenolowe roślin wyższych

## Polyphenol oxidases in higher plants

RENATA DĘBOWSKA

### Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Właściwości oksydaz polifenolowych
  - II-1. Specyficzność substratowa
  - II-2. Aktywatory i inhibitory
  - II-3. Stabilność termiczna
- III. Synteza białka enzymatycznego i jego budowa
- IV. Lokalizacja oksydaz polifenolowych
- V. Transport enzymu w komórce
- VI. Ekspresja oksydaz polifenolowych w tkankach roślinnych
- VII. Funkcje oksydaz polifenolowych
  - VII-1. Rola oksydaz polifenolowych w metabolizmie fenylopropanoidów
  - VII-2. Rola oksydaz polifenolowych w fotosyntezie
  - VII-3. Oksydazy polifenolowe w reakcjach obronnych

### Contents:

- I. Introduction
- II. Properties of polyphenol oxidases
  - II-1. Substrate specificity
  - II-2. Activators and inhibitors
  - II-3. Thermal stability
- III. Synthesis and structure of polyphenol oxidases protein
- IV. Localization of polyphenol oxidases
- V. Cell transport of the protein
- VI. Plant tissue expression of polyphenol oxidases
- VII. Function of polyphenol oxidases
  - VII-1. The role of polyphenol oxidases in phenylpropanoid metabolism
  - VII-2. The role of polyphenol oxidases in photosynthesis
  - VII-3. Polyphenol oxidases in plant protection against pathogens

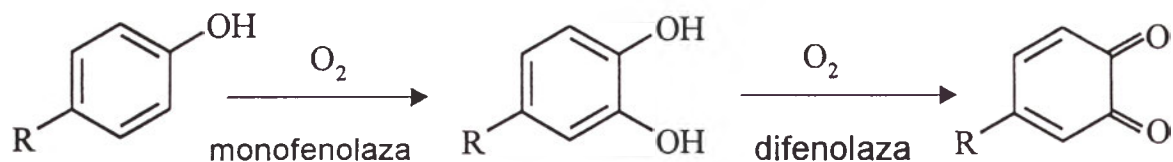
**Wykaz stosowanych skrótów:** C4H — 4-hydroksylaza kwasu cynamonowego, 4CL — ligaza 4-kumaroil-KoA, COMT — o-metylotransferaza kwasu kawowego, CuA i CuB — centrum aktywne enzymu zawierające atomy miedzi, DIECA — sól sodowa kwasu dietyloditiokarbamowego, DTT — ditiotreitrol, EDTA — kwas etylenodiaminotetraoctowy, MeJa — jasmonian metylu, PAL — amoniakolizaza L-fenyloalaniny, PPO — (ang. *polyphenol oxidases*) oksydazy polifenolowe, PSI — fotosystem I.

### I. Wstęp

Oksydazy polifenolowe (PPO) katalizują reakcje hydroksylacji monofenoli i utleniania *orto*-difenoli do *o*-chinonów (Ryc. 1). Enzymy te występują powszechnie w królestwach roślin, zwierząt i grzybów oraz u bakterii [1, 2] w postaci jedno lub dwu-funkcyjnych metaloprotein, zawierających po dwa atomy miedzi w centrum aktywnym białka. Pomimo że u roślin zostały wykryte już 50 lat temu [3] ich rola fizjologiczna jest poznana bardzo fragmentarycznie. Powstające przy udziale oksydaz fenolowych chinony

oraz produkty ich polimeryzacji i addycji są istotnym elementem hamującym wnikanie i rozprzestrzenianie się patogenów roślinnych (powstawanie nekroz) oraz ograniczającym żerowanie owadów. Postuluje się również udział reakcji *orto*-difenole — *orto*-chinony w pseudocyklicznej fosforylacji fotosyntetycznej (reakcja Mehlera). Produkty działania oksydaz — bardzo reaktywne chinony powodujące ciemnienie bulw i owoców, przyczyniają się także do obniżenia ich walorów konsumpcyjnych i estetycznych. Cechą PPO o aktywności monooksygenaz, która może mieć istotne znaczenie w biosyntezie związków fenolowych, lecz nie została w pełni udowodniona, jest zdolność do hydroksylacji monofenoli do *orto*-difenoli. Funkcje i sposoby regulacji enzymów zaangażowanych w metabolizm wtórny roślin, ciągle stosunkowo mało poznane, budzą stałe zainteresowanie badaczy. Oksydazy polifenolowe i ich geny, choć stosunkowo dobrze scharakteryzowane u roślin dwuliściennych, są w bardzo małym stopniu poznane u jednoliściennych (badania prowadzono głównie na owocach bananowca i daktylach [4-7]). Początkowo charakteryzowano oksydazy o własnościach difenolaz, które są zdolne do utleniania difenoli do chinonów. Obecnie coraz częściej badane są monofenolazy, występujące zazwyczaj w formach

Mgr.: Zakład Fizjologii Wzrostu i Rozwoju Roślin, Instytut Biologii Eksperymentalnej Roślin, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski, ul. Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa, tel.: 554 30 15, fax.: 554 20 22, e-mail: wanilia@biol.uw.edu.pl



Ryc. 1. Reakcje katalizowane przez oksydazy polifenolowe.

nieaktywnych, wymagających zapewnienia odpowiednich warunków reakcji.

Nazewnictwo oksydaz polifenolowych jest bardzo różnorodne. Enzymy hydroksylujące monofenole i utleniające difenole zwane są monooksygenazami, monofenolazami lub krezolazami (EC 1.14.18.1), podczas gdy te zdolne tylko do utleniania difenoli — difenolazami, katecholazami, tyrozynazami, *o*-difenol:O<sub>2</sub>-oksydoreduktazami lub fenolazami (EC 1.10.3.1) [1]. Do grupy oksydaz polifenolowych zalicza się również lakazy, enzymy utleniające *p*-difenole do *p*-chinonów.

Mechanizm reakcji katalizowanej przez oksydazy polifenolowe polega na wiązaniu się jonów miedzi w centrum aktywnym białka z cząsteczką tlenu oraz grupą hydroksylową substratów i przebiega jak przedstawiono na rycinie 2 [1]. Specyficzność substratowa oksydaz zależy od organizmu: u roślin utleniane są różnorodne fenole, natomiast u zwierząt specyficzność jest bardzo wąska (oksydazy utleniają tylko dihydroksyfenyloalaninę i jej bliskie pochodne).

Pomimo, że oksydazy polifenolowe znane są od bardzo dawna i występują powszechnie, ich rola fizjologiczna (np. w reakcjach zabezpieczających aparat fotosyntetyczny przed fotoutlenieniem, jak też udział w biosyntezie związków fenolowych, w tym barwników, czy poznanie szczegółów mechanizmów zaangażowania enzymów w reakcjach odpornościowych) ciągle pozostaje nie wyjaśniona i wymaga dalszych badań.

## II. Właściwości oksydaz polifenolowych

### II-1. Specyficzność substratowa

U roślin występują oksydazy zarówno o aktywności mono-, jak i difenolaz [4, 8-13]; tylko o aktywności monofenolazy lub tylko o aktywności difenolazy [8, 14, 15]. W wielu przypadkach, kiedy PPO przejawia aktywność difenolazy, aktywność monofenolazy poprzedza „lag faza” (opóźnienie w wytwarzaniu produktów reakcji), która może być skrócona w

obecności związków redukujących oraz katalitycznych ilości *o*-difenoli [1, 4, 9, 10]. PPO u roślin wykazują różną specyficzność substratową. Większość z nich jest aktywna w stosunku do katecholu, 4-metylokatecholu, kwasu chlorogenowego i katechin [3, 8, 12, 16, 17], natomiast słabo utlenia 3,4-dihydroksyfenyloalaninę — typowy substrat oksydaz zwierzęcych [1].

### II-2. Aktywatory i inhibitory

Oksydazy polifenolowe u roślin, grzybów i zwierząt występują w zdrowych tkankach najczęściej w formie nieaktywnej. Enzymy te mogą być aktywowane przez wiele czynników, zarówno biotycznych, jak i abiotycznych (detergenty, enzymy proteolityczne, poliaminy, zmiany pH, kwasy tłuszczowe, lipidy, hormony, skład podłoża, atak patogenów, mechaniczne zranienia) (Tabela 1). Spośród detergentów najsilniejszy wpływ na oksydazy mają detergenty anionowe. Wysokie stężenia detergentów mogą obniżać aktywność PPO [18].

Niektóre oksydazy są aktywowane przez enzymy proteolityczne, inne w tych warunkach nie ulegają aktywacji lub ich aktywność jest nawet hamowana [19, 20].

Większość roślinnych oksydaz fenolowych ulega aktywacji w środowisku silnie kwaśnym (pH 3,0-3,5) lub zasadowym (pH 11), [21]. Obecność detergentu w mieszaninie reakcyjnej przesuwają optimum pH w kierunku zasadowym [9, 22]. Poliaminy działające jako związki zwiększające aktywność PPO powodują wzrost wrażliwości białka na zmiany pH i temperaturę [23].

Nienasycone kwasy tłuszczowe, a zwłaszcza wolny kwas linolenowy (główny składnik lipidów błon tylakoidów) i arachidowy oraz kwas palmitynowy są silnymi aktywatorami oksydaz ze szpinaku *in vivo* (*Spinacia oleracea*) [24]. Przypuszcza się, że kwas linolenowy wpływa destrukcyjnie na strukturę tylakoidów, umożliwiając tym samym lepszy dostęp substratów do PPO związanych z błonami chloroplastów.

**Tabela 1**

Aktywatory roślinnych oksydaz polifenolowych.

Czynnik	Synteza <i>de novo</i> białka	Gatunek	Literatura
Detergenty* :			
Anionowe: SDS, DS.	-	<i>V. faba</i> , <i>S. tuberosum</i> , <i>S. oleracea</i> , <i>V. vinifera</i> , <i>P. malus</i> , <i>B. vulgaris</i> , <i>Lactuca sativa</i>	[12, 22, 80, 19, 18, 81, 23, 38, 9, 45]
Kationowe: CTAB, CP	-	<i>V. faba</i> , <i>V. vinifera</i>	[12, 81]
Obojętne: C12E9, Brij 96	-	<i>V. faba</i> , <i>V. vinifera</i>	[12, 81]
Enzymy proteolityczne: trypsyna	-	<i>V. faba</i> , <i>V. Vinifera</i> , <i>S. oleracea</i> , <i>D. carota</i>	[12, 81, 18, 24, 20, 79, 82, 25]
Poliaminy: spermina, putrescyna, etylenodiamina, diaminopropan	-	<i>V. vinifera</i>	[23]
pH	-	<i>V. faba</i> , <i>P. malus</i> , <i>V. vinifera</i> , <i>I. batatas</i> , <i>P. communis</i> , <i>Avocado</i> , <i>L. sativa</i>	[22, 34, 83, 43, 10, 45]
Mocznik	-	<i>V. faba</i> , <i>V. vinifera</i>	[21]
Kwasy tłuszczowe: kwas linolenowy, arachidowy, palmitynowy	-	<i>S. oleracea</i> , <i>V. faba</i>	[24, 25, 77]
Hormony:			
Kinetyna	+?	<i>N. tabacum</i>	[28]
IAA	+?	<i>N. tabacum</i>	[28]
Giberelina	+?	<i>Triticum</i> , <i>Prunus persica</i>	[29, 21]
Skład podłoża:			
Zasolenie	-	<i>Triticum</i> , <i>Hordeum</i>	[25]
Deficyt lub nadmiar boru	-	<i>dwuliścienne</i> , <i>N. tabacum</i>	[25, 26]
Jony Ca <sup>2+</sup>	-	<i>D. carota</i>	[79, 82, 25]
Odwodnienie	-	<i>M. acuminata</i>	[94]
Atak patogena:			
Bakterie	+	<i>L. esculentum</i>	[30, 30]
Grzyby	+	<i>L. esculentum</i>	[31]
Zranienie	+	<i>L. esculentum</i> , <i>P. malus</i> , <i>S. tuberosum</i> , <i>Zea mays</i> , <i>T. aestivum</i> , <i>Oryza sativa</i> , <i>N. tabacum</i> , <i>Capsicum annum</i> , <i>Solanum nigrum</i> , <i>B. napus</i> , <i>Brassica nigra</i> , <i>Medicago sativa</i> , <i>Phaseolus vulgaris</i> , <i>Lens culinaris</i> , <i>Cicer arietinum</i> , <i>Salix</i>	[31-36]
Związki sygnałowe:			
Kwas salicylowy	+	<i>L. esculentum</i>	[31]
Systemina	+?	<i>L. esculentum</i>	[36]
Jasmonian metylu, kwas jasmonowy	+	<i>L. esculentum</i> , <i>S. tuberosum</i> , <i>Z. mays</i> , <i>Hordeum</i> , <i>Triticum</i> , <i>O. sativa</i> , <i>N. tabacum</i> , <i>C. annum</i> , <i>S. nigrum</i> , <i>B. napus</i> , <i>M. sativa</i> , <i>P. vulgaris</i> , <i>L. culinaris</i> , <i>C. arietinum</i> , <i>Salix</i>	[31, 32, 35, 36]
Etylen	+	<i>L. esculentum</i>	[31]

\* SDS — siarczyn dodecylu, DS. — kwas 1-dekanosulfonowy, CTAB — bromek cetylotrimetyloamoniowy, CP — bromek cetylopirydyniowy, C12E9 — eter poli(9)oksyetylenolaurylowy, Brij 96 — eter poli(10)oksyetylenooleilowy.

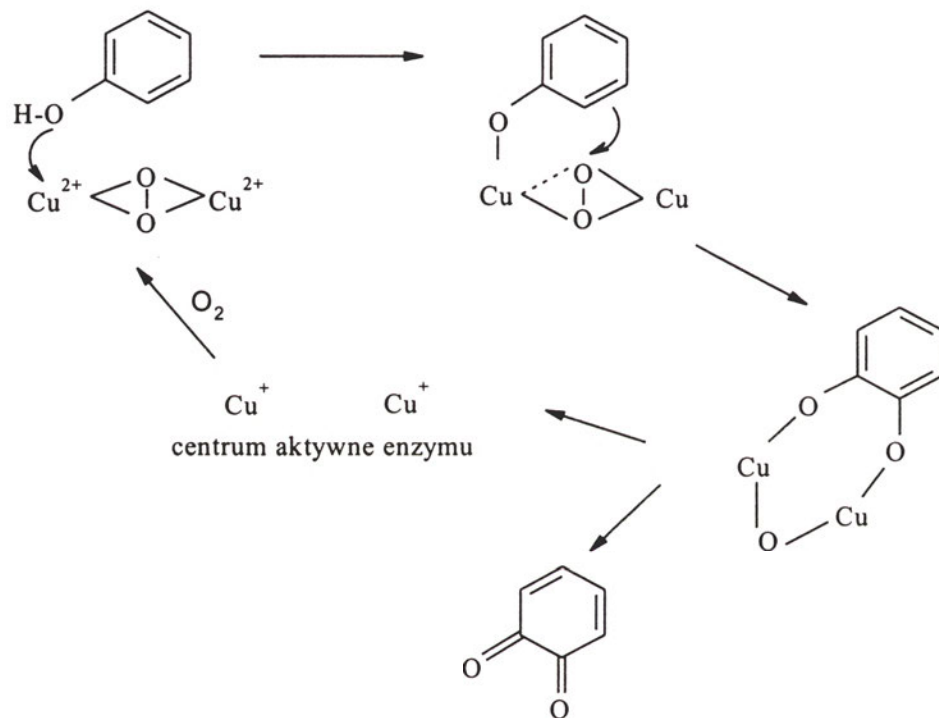
Bardzo ważnym czynnikiem decydującym o aktywności oksydaz polifenolowych jest skład podłoża, na którym rosną tkanki i rośliny. Wykazano,

że dostępność boru w podłożu wywiera regulacyjny wpływ na aktywność PPO — rośliny jednoliścienne mają niską wrażliwość na zmiany stężenia boru w

podłożu, natomiast dwuliścienne duża [25, 26]. Deficyt jonów  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ , P oraz niskie dodatnie temperatury obniżają aktywność roślinnych oksydaz polifenolowych [25, 27].

Hormony oraz związki sygnałowe pojawiające się pod wpływem ataku patogena lub zranienia podwyższają aktywność PPO najprawdopodobniej przez stymulację syntezy białka enzymu *de novo* [21, 28-36].

Promieniowanie UV powoduje wzrost aktywności oksydaz u roślin i grzybów [1]. Niektóre PPO są także aktywowane przez światło białe, niebieskie lub czerwone [20, 37].



Ryc. 2. Schemat reakcji utleniania fenoli przez oksydazy polifenolowe [1]. Zredukowane jony miedzi z centrum aktywnego białka wiążą się z tlenem cząsteczkowym, a następnie z grupą hydroksylową monofenolu; przeniesienie tlenu połączonego z miedzią w pozycję *orto*-pierścienia aromatycznego powoduje utworzenie struktury *orto*-difenolowej; po przemieszczeniu elektronów i zredukowaniu atomów miedzi w centrum aktywnym enzymu, powstaje cząsteczka chinonu.

Stopień aktywacji oksydaz fenolowych zależy od rodzaju czynnika aktywującego, tkanki oraz sposobu aktywacji enzymu. Z reguły tkanki młode wykazują silniejszą reakcję na określony czynnik. Mechanizm aktywacji PPO może polegać na zmianie struktury przestrzennej białek (dysocjacja podjednostek lub/i zmiany konformacyjne) [22, 38] lub na częściowej proteolizie enzymów (odblokowanie centrum aktywnego lub oddysocjowanie enzymów połączonych ze strukturami błoniastymi komórki) [39].

Inhibitory oksydaz polifenolowych można zaliczyć do trzech grup: związków wiążących miedź w centrum aktywnym białka (azydki, cyjanki, chelatory), aromatycznych związków współzawodniczących z substratem o centrum aktywne enzymu oraz związków wpływających na stopień utlenienia miedzi (reduktanty i utleniacze) [1]. Wrażliwość PPO na inhibitory jest zależna od gatunku rośliny, pH reakcji i obecności czynnika aktywującego (de-

tergenty, mocznik) w mieszaninie reakcyjnej [4, 8, 19, 21, 40-43].

PPO są silnie hamowane przez reduktanty (kwas askorbinowy,  $\beta$ -merkaptioetanol, DTT), utleniacze ( $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ ) oraz chelatory (EDTA, DIECA, KCN). Kompleksowanie jonów miedzi przez azydki i cyjanki może być przyczyną inaktywacji centrum aktywnego białek. Wykazano, że związki takie jak: tropolon, mimozyna, kwas fuzarynowy i 3-aminotyrozyna są również zdolne do chelatowania jonów miedzi z centrum aktywnego enzymów [1]. Związki o właściwościach redukujących (glutation, cysteina,

tiosiarczany,  $\beta$ -merkaptioetanol, DTT) reagują z miedzią w centrum aktywnym białek oraz z produktami reakcji katalizowanej przez PPO — *o*-chinonami. Kwas askorbinowy redukuje *o*-chinony do *o*-difenoli uniemożliwiając powstawanie końcowych produktów reakcji (Ryc. 1). Oksydazy z grzybów nie są wrażliwe na kwas askorbinowy w niskich stężeniach, które u roślin mogą skracać długość „lag fazy” PPO o aktywności monofenolaz. U niektórych roślin (*Mucana*) kwas askorbinowy (nawet w wysokich stężeniach) nie wpływa na aktywność PPO [1].

Związki współzawodniczące z typowymi substratami o centrum aktywne białek to: kwas benzoesowy, kwas cynamonowy i ferulowy, hydrochinon, 4-nitrokatechol, 4-nitrofenol, 4-chlorofenol, [1]. W roślinach stwierdzono obecność naturalnych inhibitorów oksydaz polifenolowych, jak np.: szczawiany i leukoantocyjaniny [25].

Tabela 2

Wielkości roślinnych oksydaz polifenolowych.

Gatunek	Liczba genów	mRNA (kb)	Prekursor (po translacji), (kDa)	Białko po usunięciu lidera	Białko aktywne	Literatura
<i>L. esulentum</i>	≥7	2.2	66-71	57-62	43-59	[83, 66, 54, 65]
<i>S. tuberosum</i>	≥6	2.0	67	57-60	42-45	[3, 49, 52]
<i>Pisum sativum</i>	-	-	67	62	45-59	[85, 65, 86, 66]
<i>N. tabacum</i>	1	2.3	73	57.5	45	[65, 53]
<i>S. oleracea</i>	1	2.2	73	62-64	42-45	[64, 84, 24, 77, 86]
<i>V. vinifera</i>	1	2.2	67	57-60	40-42	[85, 39]
<i>V. faba</i>	\$3	2.2	68	58-60	42-60	[88, 65, 86, 89]
<i>P. vulgaris</i>	-	-	-	-	45	[65]
<i>D. carota</i>	-	-	-	59	36-43	[2]
<i>P. malus</i>	\$4	2.0	66	57	42-64	[33, 38]
<i>P. americana</i>	2	2.1-2.3	64.7	54	-	[92]
<i>P. armeniaca</i>	1	2.1	67.1	56.2	-	[93]
<i>Saccharum sp.</i>	1	2.2	67	59	45-?	[48]
<i>Z. mays</i>	-	-	67	62	59	[66]

### II-3. Stabilność termiczna PPO

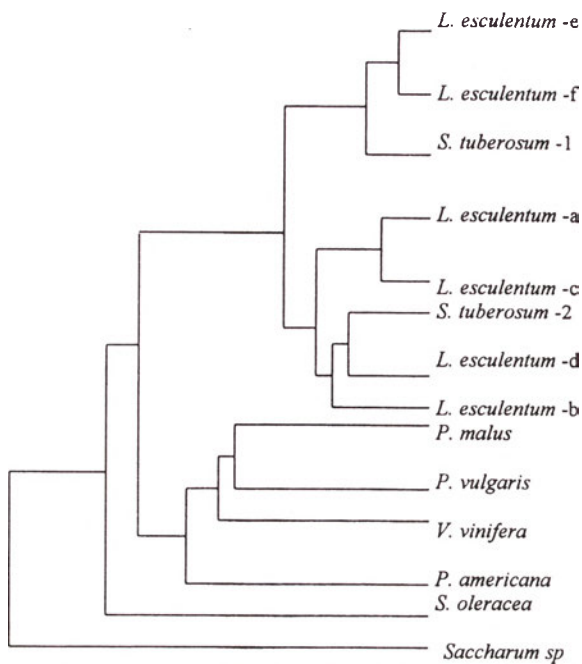
Stabilność termiczna roślinnych oksydaz polifenolowych jest wysoka. Enzymy te nie tracą aktywności w temperaturze 50°-60°C [7, 44-46], natomiast po inaktywacji w temperaturze 90°C mają zdolność do szybkiej renaturacji [47]. Wrażliwość enzymów na temperaturę wzrasta w obecności aktywatorów (SDS i poliamin, [23]) oraz w rozpuszczalnikach organicznych (brak wody uniemożliwia przebieg denaturacji białek) [1]. Enzymy mogą być przechowywane w roztworach wodnych w temperaturze -20°C przez wiele miesięcy bez znacznej utraty aktywności [46].

### III. Synteza białka enzymatycznego i jego budowa

Oksydazy polifenolowe kodowane są w genomie jądrowym przez rodzinę genów (od dwóch u *Phytolacca americana* do co najmniej siedmiu u pomidora (*Lycopersicon esculentum*) (Tabela 2). Dotychczas stwierdzono obecność tylko jednego genu kodującego PPO w owocach winorośli (*Vitis vinifera*) i moreli (*Prunus armeniaca*), liściach szpinaku, tytoniu (*Nicotiana tabacum*) i trzciny cukrowej (*Saccharum sp.*). Geny oksydaz u roślin mają otwartą ramkę odczytu, wielkości około 2 kb i nie zawierają intronów. Sekwencje genów oksydaz polifenolowych z

roślin dwuliściennych są znane, podczas gdy z jednoliściennych gen PPO zsekwencjonowano i sklonowano tylko w przypadku trzciny cukrowej. Wykazano przy tym istotne różnice w sekwencji białka pomiędzy oksydazami polifenolowymi z tych dwóch klas roślin (Ryc. 3), [48].

Każde białko oksydazy polifenolowej zbudowane jest z trzech części: domeny N-końcowej, centrum aktywnego (CuA i CuB) i domeny C-końcowej (Ryc. 4). Centrum aktywne PPO zawiera parę jonów miedzi, z których każdy jest połączony z trzema (silnie konserwowanymi u wszystkich organizmów) resztami histydynowymi. Stopień homologii regionu CuA i CuB na poziomie sekwencji aminokwasów pomiędzy PPO człowieka i bakterii wynosi odpowiednio 53% i 74%. Jony miedzi są miejscem oddziaływania enzymu zarówno z tlenem cząsteczkowym, jak i z fenolowymi substratami (Ryc. 2). Roślinne oksydazy posiadają jeszcze jeden (oprócz centrum aktywnego) obszar bogaty w reszty histydynowe, który również zdolny jest do wiązania jonu miedzi [49, 49], jednak funkcja tego obszaru nie została jeszcze określona. Domena N-końcowa roślinnych oksydaz polifenolowych jest odpowiedzialna za transport prekursora PPO do chloroplastów. Domena ta, której motyw w sekwencji aminokwasów (SPIPPDLKXSXGV) jest bardzo podobny u wielu roślin [39, 49, 51, 52] zbudowana jest z trzech części:



Ryc. 3. Dendrogram ilustrujący stopień podobieństwa pomiędzy sekwencjami białek PPO u roślin [48]. Numery genów w banku genów: *P. malus* (L29450), *P. vulgaris* (Z11702), *V. vinifera* (Z27411), *S. tuberosum* — 1 (M95196), *S. tuberosum* — 2 (U22921), *L. esculentum* — a (Z12833), *L. esculentum* — b (Z12834), *L. esculentum* — c (Z12835), *L. esculentum* — d (Z12836), *L. esculentum* — e (Z12837), *L. esculentum* — f (Z12838), *P. americana* (D45386), *S. oleracea* (Z6655), *Saccharum sp.* (U46014).

N-końcowej bogatej w serynę i treoninę, odpowiedzialnej za transport PPO do stromy; środkowej nie konserwowanej („n”-region) oraz C-końcowej, zawierającej reszty hydrofobowe, odpowiedzialnej za transport białka do tylakoidów [39, 48, 52-54]. C-końcowa domena PPO z roślin, podobnie jak N-końcowa, wrażliwa jest na proteolizę. Przypuszcza się, że domena C-końcowa pełni funkcje regulacyjne — blokuje centrum aktywne i decyduje o zmianach strukturalnych białka, może wiązać jony miedzi niezbędne do działania enzymu lub też pełni funkcje białka transmembranowego zakotwiczonego oksydazy w błonach tylakoidów [2, 39].

Do lat siedemdziesiątych oksydazy polifenolowe uważano za tetramery o wielkości podjednostek 30 kDa. W latach osiemdziesiątych wyizolowano 45 kDa białka, które *in vivo* prawdopodobnie mogło tworzyć tetramer. W latach dziewięćdziesiątych stwierdzono, że większość PPO z roślin to jednak białka monomeryczne. Obecnie wiadomo, że oksydazy polifenolowe są syntetyzowane w postaci prekursorów o masie od 73-66 kDa, które następnie ulegają proteolizie w trakcie transportu do plastydów. Białka PPO zlokalizowane w chloroplastach mają masę od 59-68 kDa i w zależności od rośliny nie tracą

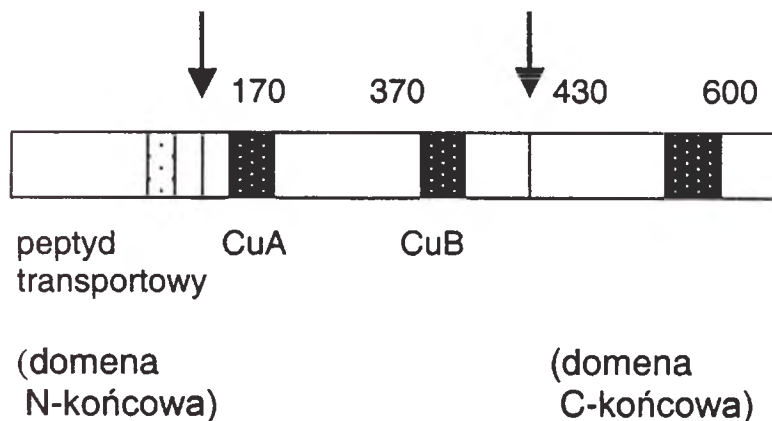
aktywności po częściowej proteolizie lub stają się aktywne dopiero po odcięciu fragmentu białka (Tabela 2).

#### IV. Lokalizacja PPO

Oksydazy polifenolowe u roślin wyższych zlokalizowane są w różnego typu plastydach: chloroplastach [55-58], amyloplastach [59-61], leukoplastach [61], etioplastach [59], chromoplastach [21, 60], a także w mitochondriach i peroksysomach [54, 62, 63] oraz mikrosomach [64]. Ponieważ oksydazy polifenolowe są u większości roślin dwuliściennych aktywne przez detergenty [65], uważa się, że jednym z mechanizmów tej aktywacji jest rozluźnienie połączenia PPO ze strukturami błoniastymi komórki. W transgenicznym roślinach o zmienionych funkcjonalnie plastydach oraz w roślinach poddanych działaniu elicitorów grzybowych (tentoksyna) specyficznego działających na plastydy, nie obserwowano obecności oksydaz polifenolowych [60]. W chloroplastach PPO są obecne w tylakoidach (na terenie stromy lub związane z błonami) [60, 61, 66, 67]. Obecność oksydaz nie związanych z błonami na terenie cytoplazmy lub wakuoli stwierdzono tylko w dojrzewających owocach oraz starzejących się i uszkodzonych tkankach [60, 68]. Pod wpływem zranienia lub zgniecenia bulw ziemniaka obserwowano zmianę w lokalizacji PPO — z powierzchni ziaren skrobi do cytoplazmy i wakuoli, w której obecność enzymu stwierdzono w połączeniu ze złogami melanin [68].

Lokalizacja oksydaz fenolowych jest specyficzna tkankowo. Enzymy zlokalizowano tylko w komórkach mezofilu u sorgo (nie występują natomiast w komórkach pochwy okołowiązkowej i komórkach szparek) [60], epidermie *Aegopodium* (ale nie w komórkach szparkowych); w parenchymie otaczającej naczynia, w komórkach pochwy okołowiązkowej oraz komórkach magazynujących fenole hiacynta wodnego (nie występują w miękiszu palisadowym i gąbczastym) [58] oraz w endodermie korzeni bawełny (*Gossypium*) (brak tych enzymów w kortalnej warstwie komórek oraz w epidermie i walcu osiowym) [69]. Nie wszystkie plastydy badanych tkanek zawierały aktywne formy enzymów [55, 58]. U niektórych roślin PPO można zlokalizować tylko za pomocą przeciwciał, pod wpływem stresu lub czynnika aktywującego enzymy [58, 70]. Pojawienie się aktywnych form oksydaz zależy wtedy od typu stresu działającego na roślinę i tkankę, w której nastąpi indukcja lub aktywacja (klony specyficzne tkankowo).





Ryc. 4. Struktura genu oksydaz polifenolowych u roślin.  
 □ — region bogaty w reszty cysteinowe,  
 ■ — region bogaty w reszty histydynowe,  
 → — miejsca wrażliwe na proteolizę,  
 CuA i CuB — centrum aktywne enzymu [2].

Obserwowano korelacje między wysoką zawartością fenoli i obecnością PPO w komórkach mezofilu sorgo, idioblastach pomidora, niektórych warstwach endodermy korzeni bawełny, w tkance hiacynta wodnego i epidermie *Aegopodium* [31, 58-61, 69], co sugerowałoby udział PPO w biosyntezie związków fenolowych. Z drugiej strony u roślin transgenicznych pozbawionych aktywności oksydaz fenolowych, poziom fenoli (a w szczególności kwasu kawowego, *orto*-flawonoidów, rutyny i delfinidyny) nie ulegał zmianie [60, 61]. Prawdopodobnie aktywność peroksydaz i innych enzymów hydroksylujących (takich jak monooksygenazy zawierające cytochrom P<sub>450</sub>) była w tych tkankach wystarczająca do utrzymania biosyntezy *orto*-difenoli na niezbędnym poziomie.

## V. Transport enzymu w komórce

U roślin transport oksydaz polifenolowych do chloroplastów przebiega dwuetapowo. Prekursor o masie 67 kDa w trakcie transportu do stromy chloroplastów ulega proteolizie do 62 kDa (reakcja zależna od ATP), a następnie w trakcie translokacji do stromy tylakoidów — do białka o masie 59 kDa (reakcja zależna od światła). Jony miedzi nie są konieczne do tych procesów, choć niskie stężenia Cu<sup>2+</sup> hamowały pierwszy etap transportu PPO [66]. Efektywność transportu oksydaz zależała od światła, stopnia rozwoju chloroplastów oraz wieku roślin. Elicitory grzybowe hamowały transport PPO do chloroplastów blokując przejście prekursora przez błony lub uniemożliwiając proteolizę białek niezbędną do ich aktywacji [59, 60, 66].

## VI. Ekspresja PPO w tkankach roślinnych

Oksydazy polifenolowe ulegają ekspresji przede wszystkim w młodych, rozwijających się częściach

roślin (pąkach, liściach, korzeniach) oraz kwiatach i owocach. Zaobserwowano wysoką ekspresję PPO w młodych liściach i korzeniach oraz merystemach apikalnych u winorośli, ziemniaka, pomidora i trzciny cukrowej [31, 39, 48, 49]. Oksydazy z owoców moreli i *P. americana* ulegają ekspresji tylko w niedojrzałych, zielonych, zawierających betalainy owocach. U tytoniu i pomidora PPO ulegają ekspresji we wczesnych etapach rozwoju kwiatów (primordia kwiatowe, zamknięte kielichy), natomiast u ziemniaka tylko w całkowicie otwartych kwiatach [49, 53, 54]. Nie stwierdzono obecności mRNA oksydaz w dojrzałych organach roślin, nawet (u tytoniu) pod wpływem działania stresu [53]. Ponieważ oksydazy polifenolowe są kodowane przez rodzinę genów, ekspresja poszczególnych genów podlega regulacji czasowej i tkankowej [52].

## VII. Funkcje oksydaz polifenolowych

Rola oksydaz fenolowych nie jest do końca poznana. Uważa się, że pełnią one funkcje obronne przy zranieniach i ataku patogenów, a w zdrowych tkankach uczestniczą w syntezie fenylopropanoidów (barwników i prekursorów ściany komórkowej) oraz biorą udział w reakcjach fotosyntetycznych.

### VII-1. Rola PPO w metabolizmie fenylopropanoidów

Szlak biosyntezy fenylopropanoidów prowadzący do powstania lignin, flawonoidów, izoflawonoidów, kumaryn i innych ważnych metabolitów wtórnych u roślin jest od lat przedmiotem intensywnych badań. Wiele enzymów szlaku fenylopropanoidów (PAL, C4H, 4CL, COMT) zostało oczyszczonych do homogenności, sklonowanych i zbadanych na poziomie molekularnym. O ile drogi metoksylicacji związków

fenolowych zostały stosunkowo dobrze poznane, to wciąż niewiele wiadomo o reakcjach hydroksylacji w pozycji 3 i 5 pochodnych kwasu *p*-kumarowego. Nie wiadomo, czy w reakcjach tego typu substratami dla enzymów hydroksylujących są wolne związki typu C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub> i C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub>, czy też ich estrowe lub glikozydowe pochodne [71]. Już w roku 1969 scharakteryzowano i oczyszczono enzym, który utleniał difenole i hydroksylował (w warunkach redukujących) kwas *p*-kumarowy do kwasu kawowego [72]. W 1983 roku B o l w e l l i B u t t wysunęli przypuszczenie o udziale PPO w biosyntezie lignin w hypokotylach szpinaku [73].

Obecnie wydaje się, że oksydazy fenolowe mogą brać udział w hydroksylacji monofenoli do *orto*-difenoli (podobnie jak hydroksylazy zawierające cytochrom P<sub>450</sub>) będąc jednym z enzymów szlaku biosyntezy fenylopropanoidów [71]. Przypuszczenie o udziale PPO w biosyntezie fenylopropanoidów wydaje się uzasadnione, zwłaszcza, że u roślin dwuliściennych oksydazy polifenolowe występują głównie w strukturach, w których zachodzi synteza związków fenolowych — w plastydach i mikrosomach [60]. PPO z niektórych roślin (banany, pataty (*Ipomea batatas*), maliny, morele) są aktywne w pH zasadowym, podobnie jak kluczowy enzym w biosyntezie fenylopropanoidów — amoniakoliaza L-feniloalaniny. Aktywacja oksydaz fenolowych w chloroplastach nieuszkodzonych tkanek następowałaby na skutek alkalizacji stromy na świetle. H a l l i w e l l [74] stwierdził, że hydroksylacja kwasu *p*-kumarowego do kwasu kawowego zachodziła tylko w oświetlonych chloroplastach, a reakcja była hamowana przez typowe inhibitory oksydaz. Udział PPO w hydroksylacji kwasu *p*-kumarowego i jego estrowych i glikozydowych pochodnych do kwasu kawowego w warunkach zasadowych wykazali W a n g i w s p. [71] u *Lithospermum erythrorhizon* oraz T a n a k a i K o j i m a [40] w korzeniach patatów.

Produkty działania oksydaz polifenolowych — bardzo reaktywne chinony powodują (w czasie przechowywania lub transportu) ciemnienie bulw i owoców, czym przyczyniają się do obniżenia walorów konsumpcyjnych i estetycznych produktów spożywczych. Wielu hodowcom zależy na obniżeniu aktywności PPO w tkankach roślin, gdyż to z ich działaniem wiążą swe straty. W czasie dojrzewania kwiatów i owoców oksydazy ulegają odłączeniu od błon (stają się enzymami cytoplazmatycznymi). Mając kontakt z substratami utleniają je, powodując powstawanie zabarwienia, które świadczy o dojrzałości kwiatu lub owocu, a po pewnym czasie o jego przekwitaniu lub psuciu się. Od lat siedemdzie-

siątych postuluje się udział PPO w syntezie barwników melaninowych u zwierząt, a także tanin, flawonoidów oraz alkaloidów u roślin [21, 25, 68, 75]. Ponadto stwierdzono, że oksydazy polifenolowe uczestniczą w powstawaniu twardych okryw nasennych [76], choć niektórzy uważają, że taką rolę należy raczej przypisywać peroksydazom [61].

## VII-2. Rola PPO w fotosyntezie

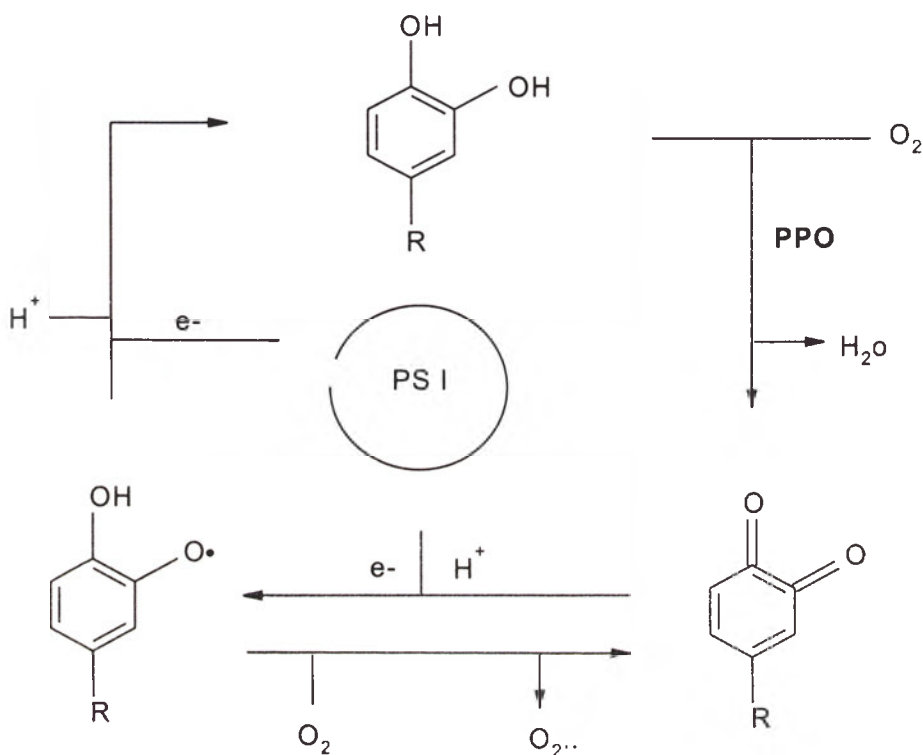
W zdrowej tkance funkcje oksydaz polifenolowych w roślinach dwuliściennych wiąże się z lokalizacją enzymów na terenie chloroplastów. Obserwowano korelacje między wysoką zawartością tlenu a obecnością PPO w chloroplastach [60, 61]. Przypuszcza się, że enzymy te mogą pełnić buforującą rolę w stosunku do O<sub>2</sub>, którego nadmiar uszkadza aparat fotosyntetyczny. Powstające w wyniku utlenienia *o*-difenoli *o*-chinony byłyby z powrotem redukowane przy udziale elektronów pochodzących z PSI i NADPH (Ryc. 5) [61, 77, 37].

## VII-3. Rola PPO w reakcjach obronnych

Oksydazy polifenolowe zaangażowane są w mechanizm reakcji obronnych roślin przy zranieniach i ataku patogenów. Funkcję tę pełnią przede wszystkim enzymy aktywne w niskim pH. W uszkodzonej tkance dochodzi do zakwaszenia treści komórek na skutek rozerwania wakuoli, co sprawia, że uaktywniają się oksydazy polifenolowe, które rozpoczynają reakcje utleniania fenoli (w uszkodzonej tkance enzymy mają swobodny dostęp do potencjalnych substratów). Powstające w reakcjach oksydacyjnych chinony szybko polimeryzują tworząc fizyczne bariery odgraniczające zdrową tkankę od tkanki uszkodzonej, zapobiegając wnikaniu patogenów [60, 61]. Dodatkowo produkty reakcji katalizowanej przez PPO wiążą się z białkami obniżając potencjalne wartości odżywcze zranionej lub zaatakowanej tkanki i tworzą ciemne barwniki charakterystyczne dla uszkodzonej tkanki [75]. Związki fenolowe hamują wzrost bakterii oraz aktywność enzymów degradujących ścianę komórkową. Nadekspresja PPO w transgenicznych roślinach pomidora powodowała wyraźne zmniejszenie się populacji *Pseudomonas syringae* [30]. Produkty reakcji katalizowanej przez PPO hamują enzymy związane z patogenezą (poligalakturonazę, syntazę glukanu) oraz reagują z białkami (taniny) tworząc nierozpuszczalne kompleksy, co w przypadku pektynaz prowadzi do ich inaktywacji [75]. Akumulacja fenoli i PPO w idioblastach pomidora wskazuje, że funkcją oksydaz jest ge-

nerowanie chinonów w reakcji obronnej na uszkodzenie [31]. Działanie fenoli jest selektywne — związki te pełnią rolę obronną tylko w stosunku do niektórych patogenów. Choć PPO działa miejscowo (kontroluje obszar infekcji), to plamy nekrotyczne (obumieranie zaatakowanej tkanki) pojawiają się nie tylko wokół miejsca wtargnięcia patogenu, ale również tam gdzie patogen penetruje tkankę [31].

jej zdolności do odpowiedzi na sygnał [31-34]. Zwykle, niezależnie od wieku rośliny, najbardziej wrażliwe są tkanki młode, u których indukcja oksydaz fenolowych powoduje zahamowanie wzrostu [31, 32]. Choć Ci p o l l i n i [32] nie obserwował zmian w aktywności PPO w czasie wzrostu roślin, to wraz z wiekiem rośliny zmniejszała się wrażliwość enzymu na działanie czynnika stresowego. Synteza mRNA w



Ryc. 5. Rola PPO w fotosyntetycznej reakcji Mehlera [61].

Interesujące wydają się interakcje roślinnych i grzybowych oksydaz polifenolowych. O ile PPO z roślin mogą hamować enzymy grzybów i inaktywować ich toksyczne związki (fitotoksyny produkowane przez patogeny [61]), to PPO z grzybów mogą powodować tlenową polimeryzację fenoli gospodarza, czyniąc je mniej efektywnymi [21, 25].

Przeprowadzono wiele badań wskazujących na udział oksydaz polifenolowych w szlaku systemicznej odpowiedzi na stres. W liściach pomidora nadekspresja genu prosysteminy powodowała aktywację i 70-krotny wzrost ilości białka PPO. Podobny efekt aktywacji oksydaz obserwowano po inkubacji liści w roztworze jasionianu metylu. MeJa był silniejszym aktywatorem enzymów niż systemina i zranienie [35, 36]. Związki sygnałowe pojawiające się pod wpływem stresów (kwas salicylowy, etylen, MeJa) specyficznie indukują syntezę mRNA — poszczególne geny z rodziny genów PPO ulegają transkrypcji w zależności od rodzaju stresu, wieku i rodzaju tkanki poddawanej działaniu określonego czynnika i

młodych liściach ziemniaka następowała pod wpływem zranienia, ataku patogenów, MeJa i kwasu salicylowego, natomiast w starych liściach — pod wpływem etylenu [31]. Nie obserwowano natomiast syntezy białek *de novo* w uszkodzonych bulwach ziemniaka [68]. Niektóre rośliny (*Glycine max*) mają konstytutywny wysoki poziom aktywności oksydaz wystarczający do obrony przed zranieniem, niezmienny w odpowiedzi na MeJa lub stres mechaniczny, u innych (pomidor, tytoń, ziemniak) aktywność PPO wielokrotnie wzrasta przy zranieniu i działaniu MeJa [35]. W dużej grupie roślin (*Brassica*, *Hordeum*, *Oryza*, *Phaseolus*, *Lens*, *Cicer*) aktywność enzymów jest niska i nie wzrasta lub wzrasta niewiele pod wpływem stresów. Związki sygnałowe indukują oksydazy fenolowe nie tylko w miejscu działania stresu, ale również w tkankach oddalonych [34].

Dotychczasowe osiągnięcia nie wyjaśniają w pełni funkcji oksydaz polifenolowych u roślin. O ile ich rola w reakcjach obronnych jest stosunkowo dobrze udokumentowana, wciąż brakuje danych o

funkcji PPO w zdrowej tkance (np. o przypuszczalnym udziale oksydaz w reakcjach fotosyntetycznych czy syntezie związków fenolowych w szlaku fenylpropanoidów). Obecnie trwają badania nad uzyskaniem roślin transgeniczných z obniżoną ekspresją genów oksydaz polifenolowych w celu weryfikacji hipotezy o udziale enzymów w tworzeniu barwników w kwiatach oraz w dojrzewających lub/i dojrziałych owocach.

Artykuł otrzymano 11 czerwca 2001  
Zaakceptowano do druku 6 grudnia 2001

## Piśmiennictwo

- Burton SG (1994) *Catalysis Today* **22**: 459-487
- van Gelder CWG, Flurkey WH, Wichers HJ (1997) *Phytochem.* **45**: 1309-1323
- Arnon DI, (1949) *Plant Physiol* **24**: 1-15
- Sojo MM, Nuñez—Delicado E, García—Carmona F, Sánchez—Ferrer A (1998) *J Agric Food Chem* **46**: 4931-4936
- Sojo MM, Nuñez—Delicado E, García—Carmona F, Sánchez—Ferrer A (1999) *J Agric Food Chem* **47**: 518-523
- Sojo MM, (2000) *J Agric Food Chem* **48**: 5459-5464
- Hasegawa S, Maier VP, (1980) *J Agric Food Chem* **28**: 891-893
- Shin R, Froderman T, Flurkey WH (1997) *Phytochem* **45**: 15-21
- Escribano J, Cabanes J, Garcia-Carmona F (1997) *J Sci Food Agric* **73**: 34-38
- Espin JC, Trujano MF, Tudela J, Garcia-Canovas F (1997) *J Agric Food Chem* **45**: 1091-1096
- Espin JC, Morales M, Varon R, Tudela J, Garcia-Canovas F (1997) *Phytochem* **44**: 17-22
- Sanchez—Ferrer A, Bru R, Garcia-Carmona F (1990) *Anal Biochem* **184**: 279-282
- Gonzalez EM, Ancos B, Cano MP (1999) *J Agric Food Chem* **47**: 4068-4072
- Das JR, Bhat SG, Gowda LR (1997) *J Agric Food Chem* **45**: 2031-2035
- Rompel A, Fischer H, Meiwes D, Buldt-Karentzopoulos K, Magrini A, Eicken C, Gerdemann C, Krebs B (1999) *FEBS Letters* **445**: 103-110
- Cano MP, Lobo MG, Ancos B, Galeazzi M (1996) *J Agric Food Chem* **44**: 3075-3079
- Shepovitsky YG, Brudvig GW (1996) *Biochem* **35**: 16255-16263
- Sanchez-Ferrer A, Villalba J, Garcia-Carmona F (1989) *Phytochem* **28**: 1321-1325
- Sanchez-Ferrer A, Laveda F, Garcia-Carmona F (1993) *J Agri. Food Chem* **41**: 1219-1224
- Tolbert NE (1973) *Plant Physiol* **51**: 244
- Mayer AM, Harel E (1979) *Phytochem* **18**: 193-215
- Jimenez M, Garcia-Carmona F (1996) *Phytochem* **42**: 1503-1509
- Jimenez-Atienzar M, Pedreno MA, Garcia-Carmona F (1991) *Biochem Intern* **25**: 861-868
- Goldbeck JH, Cammarata K V (1981) *Plant Physiol* **67**: 977-984
- Mayer AM (1987) *Phytochem* **26**: 11-20
- Ruiz JM, Garcia PC, Rivero RM, Romero L (1999) *Physiol Plant* **106**: 151-157
- Martinez-Tellez MA, Lafuente MT (1997) *J Plant Physiol* **150**: 674-678
- Stafford HA, Galston AW (1970) *Plant Physiol* **46**: 763-767
- Hruskocy M, Flurkey WH (1986) *Phytochem* **25**: 329-332
- Li L, Steffens JC, (1997) *Plant Physiol* **114**: 1153
- Thipyapong P, Steffens JC (1997) *Plant Physiol* **115**: 409-418
- Cipollini DF, Redman AM (1999) *J Chem Ecol* **25**: 271-281
- Boss PK, Gardner RC, Janssen B, Ross GS (1995) *Plant Mol Biol* **27**: 429-433
- Thipyapong P, Hunt MD, Steffens JC (1995) *Phytochem* **40**: 673-676
- Constabel CP, Ryan CA (1998) *Phytochem* **47**: 507-511
- Constabel CP, Bergey DR, Ryan CA (1995) *Proc Natl Acad Sci* **92**: 407-411
- Meyer HU, Biehl B (1982) *Phytochem* **21**: 9-12
- Marques L, Fleuriet A, Macheix JJ (1995) *Plant Physiol Biochem* **33**: 193-200
- Dry IB, Robinson SP (1994) *Plant Mol Biol* **26**: 495-502
- Tanaka M, Kojima M (1991) *Arch Biochem Biophys* **284**: 151-157
- Steiner U, Schliemann W, Bohm H, Streck D (1999) *Planta* **208**: 114-124
- Richardson A, Stewart D, McDougall GJ (1997) *Planta* **203**: 35-43
- Nozue M, Souri M, Arakawa D, Kojima M (1998) *J Plant Physiol* **153**: 552-557
- Sakiroglu H, Kufrevioglu OI, Kocacaliskan I, Oktay M, Onganer Y (1996) *J Agric Food Chem* **44**: 2982-2986
- Chazarra S, Cabanes J, Escribano J, Garcia-Carmona F (1996) *J Agric Food Chem* **44**: 984-988
- Dębowska R, Podstolski A (2001) *J Agric Food Chem* **49**: 3422-3437
- Arslan O, Temur A, Tozlu I (1998) *J Agric Food Chem* **46**: 1239-1241
- Bucheli CS, Dry IB, Robinson SP (1996) *Plant Mol Biol* **31**: 1233-1238
- Hunt MD, Eannetta NT, Yu H, Newman SM, Steffens JC (1993) *Plant Mol Biol* **21**: 59-68
- Joy IVR W, Sugiyama M, Fukuda H, Komamine A (1995) *Plant Physiol* **107**: 1083-1089
- Kuwabara T (1995) *FEBS Letters* **371**: 195-198
- Thygesen PW, Dry IB, Robinson SP (1995) *Plant Physiol* **109**: 525-531
- Goldman MHS, Seurinck J, Marins M, Goldman GH, Mariani C (1998) *Plant Mol Biol* **36**: 479-485
- Shahar T, Henning N, Gutfinger T, Hareven D, Lifshitz E (1992) *The Plant Cell* **4**: 135-147
- Czaninski Y, Catesson AM (1974) *In Electron Microscopy of Enzyme* New York ISBN 0-442-25679-5 **2**: 66-78
- Henry EW (1976) *Z Pflanzenphysiol* **78**: 446-452
- VK C, Duke SO (1981) *Protoplasma* **108**: 319-327
- Martyn RD, Samuelson DA, Freeman TE (1979) *Cytology and Histology* **69**: 1278-1287
- Vaughn KC, Duke SO (1981) *Physiol Plant* **53**: 421-428
- Vaughn KC, Duke SO (1984) *Physiol Plant* **60**: 257-261
- Vaughn KC, Lax AR, Duke SO (1988) *Physiol Plant* **72**: 659-665
- Parish RW (1972) *Z Pflanzenphysiol* **66**: 176-188
- Parish RW (1971) *Eur J Biochem* **31**: 446-455
- Olah AF, Mueller WC (1981) *Protoplasma* **106**: 231-248
- Flurkey WH (1986) *Plant Physiol* **81**: 614-618
- Sommer A, Ne'eman E, Steffens JC, Mayer AM, Harel E (1994) *Plant Physiol* **105**: 1301-1311
- Dębowska R, Kwapisz M, Podstolski A (2000) *Plant Physiol. Biochem* **38**: 16.
- Parlington JC, Smith C, Bolwell GP (1999) *Planta* **207**: 449-460
- Mueller WC, Beckman CH (1978) *Can J Bot* **56**: 1579-1587
- Murata M, Tsuruyani M, Hagiwara S, Homma S (1997) *Biosci Biotech Biochem* **61**: 1459-1499
- Wang Z, Li S, Loscher R, Heide L (1997) *Arch Biochem Biophys* **347**: 249-255
- Vaughn PFT, Butt VS (1969) *Biochem J* **113**: 109-115
- Bolwell GP, Butt VS (1983) *Phytochem* **22**: 37-45
- Halliwell B (1975) *Eur J Biochem* **55**: 355-360

75. Friedman M (1997) *J Agric Food Chem* **45**: 1523-1540
76. Marbach I, Mayer A M (1975) *Plant Physiol* **56**: 93-96
77. Hutcheson S W, Buchanan B B (1980) *Plant Physiol* **66**: 1150-1154
78. Hind G, Marshak D R, Coughlan S J (1995) *Biochem* **34**: 8157-8164
79. Soderhall K, Carlberg I, Eriksson T (1985) *Plant Physiol* **78**: 730-733
80. Moore B M, Flurkey W H (1990) *J Biol Chem* **265**: 4982-4988
81. Sanchez-Ferrer A, Bru R, Garcia-Carmona F (1989) *Plant Physiol* **91**: 1481-1487
82. Carlberg I, Soderhall K, Eriksson T (1985) *FEBS Letters* **187**: 295-298
83. Valero E, Garcia-Carmona F (1992) *Biochem J* **286**: 623-626
84. Newman S M, Eannetta N T, Yu H, Prince J P, Vicente M C, Tanksley S D, Steffens J C (1993) *Plant Mol Biol* **21**: 1035-1051
85. Angleton E L, Flurkey W H (1984) *Phytochem* **23**: 2723-2725
86. Lanker T, Flurkey W H, Hughes J P (1988) *Phytochem* **27**: 3731-3734
87. Sokolenko A, Fulgosi H, Gal A, Altschmied L, Ohad I, Herrmann R G (1995) *FEBS Letters* **371**: 176-180
88. Flurkey W H (1985) *Plant Physiol* **79**: 564-567
89. Lanker T, King T G, Arnold S W, Flurkey W H (1987) *Physiol Plant* **69**: 323-329
90. Robinson S P, Dry I B (1992) *Plant Physiol* **99**: 317-323
91. Cary J W, Lax A R, Flurkey W H (1992) *Plant Mol Biol* **20**: 245-253
92. Joy I V R W, Sugiyama M, Fukuda H, Komamine A (1995) *Plant Physiol* **107**: 1083-1089
93. Chevalier T, Rigal D, Mbegule-A-Mbeguie D, Gaillard F, Richard-Forget F, Fils-Lycaon R F (1999) *Plant Physiol* **119**: 1261-1269
94. Waliszewski K N, Garcia R H, Ramirez M, Garcia M A (2000) *Drying Technol* **18**: 1327-1337

# Recenzja książki „Inżynieria genetyczna — u progu nowej ery”, pracy zbiorowej pod redakcją Andrzeja Zimniaka

SŁAWOMIR PIKUŁA

Ostatnio nie można narzekać na polski rynek książek popularnonaukowych, ponieważ ukazuje się wiele pozycji dobrze wybranych, ciekawych, a także starannie wydanych. Jest kilka zasłużonych na tym polu wydawnictw, od lat redagujących serie popularnonaukowe, na które składają się przeważnie tłumaczenia. Nie oznacza to jednak, że nie mamy rodzimych popularyzatorów. Wydawcy wybierają tłumaczenia ze względu na szybkość i łatwość zakupu wybranego, gotowego tomu.

W tym kontekście pozytywnie należy ocenić niebagatelną pracę, włożoną przez Centrum Upowszechniania Nauki (CUN) Polskiej Akademii Nauk, w wydanie tomu na temat inżynierii genetycznej autorstwa kilkunastu polskich naukowców. Trzynastu autorów tomu prezentuje kolejne rozdziały, przedstawiając wiedzę z punktu widzenia swoich specjalności. Należy przy tym podkreślić, że pomimo takiej strategii wydawniczej, zbiór napisany jest dobrą polszczyzną i zrozumiałym językiem, spełnia więc kryteria nie tylko merytoryczne (co jest oczywiste), lecz także wszelkie warunki stawiane pozycjom popularyzatorskim, przeznaczonym dla dużej grupy odbiorców. Niewątpliwie spora w tym zasługa redaktora, który trudniejsze partie tekstu umieścił osobno w ramach; te fragmenty w trakcie lektury można pominąć, co zasadniczo nie wpłynie na zrozumienie wymowy całego rozdziału. Teksty zawierają ponadto poglądowe tablice, ilustracje i tabele, co ułatwia czytanie. Humorystyczne rysunki ożywiają i urozmaicają całość pracy zbiorowej.

Bieżąca rynkowa oferta popularyzatorska obejmuje przynajmniej kilka pozycji dotyczących inżynierii genetycznej. Książki te tradycyjnie zawierają krótkie wprowadzenie do genetyki (np. wyjaśnienie, co to jest gen, transgenizacja, klonowanie i dodatkowo słowniczek stosowanych w tej dziedzinie termi-

nów naukowych), a potem opisy osiągnięć i możliwości. W recenzowanym tomie wydanym przez CUN takie klasyczne (i również bardzo dobre) teksty zajmują tylko połowę objętości książki, reszta to wypowiedzi bioetyków, prawników, teologa, ewolucjonisty i krytyka literackiego, a także oficjalne deklaracje i stanowiska różnych gremiów, w tym prezydium Polskiej Akademii Nauk. Właśnie ta część wyróżnia książkę na rynku i szczególnie warta jest polecenia. Uzyskujemy bowiem podczas jej lektury nie tylko odpowiedź na pytanie „jak?”, ale także „dlaczego?”, „czy możemy?”, „co z tego wyniknie?”, a także „co myślą o tym inni?”. A jeśli nawet odpowiedzi nie zawsze są jednoznaczne (bo przy naszej dzisiejszej wiedzy być nie mogą), to dają do myślenia i dostarczają całościowej informacji. Właśnie to jest w tomie najważniejsze: przedstawienie całościowej, przekrojowej informacji o naukowym i cywilizacyjnym wyzwaniu, jakim jest możliwość ingerencji między innymi w genom człowieka.

O treści książki wiele mówią tytuły wybranych rozdziałów: „Manipulacje genetyczne — przekleństwo czy nadzieja?”, „Naturalne procesy transgenizacji”, „Klonowanie zwierząt”, „Bioetyka a genetyka”, „Stwórczość człowieka w dziedzinie gentechnologii”, „Deklaracja w obronie klonowania i niezawisłości badań naukowych”, „Stanowisko Prezydium PAN w sprawie form transgenicznych...”, „Strach przed sobowtórem — literackie i filmowe egzemplifikacje naszych lęków i nadziei”.

Gorąco polecam tę dobrze zaplanowaną, przekrojową i ciekawą książkę. Adresowana jest do wszystkich, od młodzieży szkolnej do naukowców z innych specjalności niż genetyka — chociaż i genetycy odnajdą w drugiej części tomu cywilizacyjne, kulturowe i socjologiczne echa swojej własnej działalności.

„Inżynieria genetyczna — u progu nowej ery”, praca zbiorowa pod redakcją Andrzeja Zimniaka, cena 25 zł; sprzedaż wysyłkowa: CUN PAN, PKiN, 00-901 Warszawa; tel. (0-22) 656 7131, 826 2537; e-mail: cunpkin@pan.pl (koszt przesyłki pokrywa Wydawca).

4<sup>th</sup> Parnas Conference

MOLECULAR MECHANISMS OF CELL ACTIVATION: BIOLOGICAL SIGNALS AND THEIR  
TARGET ENZYMES

Wroclaw

September 15–17, 2002

POLAND

Dear Colleagues

You are cordially welcomed to attend the 4<sup>th</sup> Parnas Conference organized by the Polish and Ukrainian Biochemical Societies and Wroclaw University. The Conference will be held from September 15 to 17 as one of the scientific meetings celebrating the 300 anniversary of Wroclaw University.

This is a way to express appreciation for Polish scientists from Lviv University for their participation in the restoration of Wroclaw University after the second world war as well as for the previous generations of German scientists who created and developed our University. This unique multinational cultural heritage makes Wroclaw the best place for the meeting of Polish and Ukrainian biochemist and famous scientist, Jakub Karol Parnas, who founded the Lviv biochemical school.

We hope that this Conference will stimulate further development of this collaboration and consolidation of the friendship of Polish and Ukrainian Scientists.

For the Organizing Committee

Andrzej Dżugaj

**ORGANIZERS OF THE CONFERENCE:**

\*The Polish Biochemical Society

\*The Ukrainian Biochemical Society

\*Wroclaw University

**ORGANIZING COMMITTEE**

**Jolanta Barańska (Poland)-Co-Head**

**Sergiy Komisarenko (Ukraine)-Co-Head**

**Andrzej Dżugaj (Poland)-Co-Head**

Stefan Angielski (Poland)

Lyudmila Drobot (Ukraine)

Jerzy Duszyński (Poland)

Leszek Kaczmarek (Poland)

Marian Kochman (Poland)

Liliana Konarska (Poland)

Sergiy Kosterin (Ukraine)

Janina Kwiatkowska-Korczak (Poland)

Elwira Lisowska (Poland)

Maria Malicka-Błaszkiwicz (Poland)

Gennadiy Matsuka (Ukraine)

Maciej Nałęcz (Poland)

Włodzimierz Zagórski-Ostoja (Poland)

Antoni Polanowski (Poland)

Andrij Sibirny (Ukraine)

Rostyslav Stoika (Ukraine)

Tadeusz Wilusz (Poland)

Lech Wojtczak (Poland)

Zofia Zielińska (Poland)

**GENERAL INFORMATION**

***Deadlines***

**April 30, 2002 — Registration**

**May 31, 2002 — Payment, Confirmation, Abstract**

***Conference Venue***

**Institute of Chemistry, Wroclaw University**

***The working language of the Conference will be English***

***Registration***

Registration will be accepted on the Accommodation Form only (please visit: [www.biol.uni.wroc.pl/instzool](http://www.biol.uni.wroc.pl/instzool)). All participants will receive additional information with an official invitation after their Application Form has been confirmed.

### **Hotel Accommodation & Social program**

Hotel Accommodation will be provided at the hotels "Mercure Panorama" and "Sajgon".

Prices per day are:

"Mercure Panorama": single room — 300 PLN (appr. 82 EURO)

double room — 330 PLN (appr. 90 EURO)

"Sajgon": single room — 175 PLN (appr. 48 EURO)

double room — 188 PLN (appr. 52 EURO)

### **Conference Fee**

<b>Conference fee</b>	<b>Before April 30, 2002</b>	<b>After April 30, 2002</b>
PBS members	150 PLN	200 PLN
Participants under 26	80 PLN	100 PLN
Full participants	250 PLN	300 PLN

The conference fee includes: a conference bag with conference papers, the conference program, the abstract book, a welcoming party, coffee and refreshments during breaks.

### **CALL FOR ABSTRACT**

Conference registrants are welcome to submit abstracts for oral presentation and poster sessions (oral presentations will be made by the invited speakers).

The abstracts are to be received by May 31, 2002 and should be submitted together with the completed Registration Form.

Abstracts must be written in English (the A4 formate).

MS Word 7.0 or 6.0 are preferable. 14 point Times New Roman Font type, left alignment should be used. All margins should be set to 2.5 cm (top, bottom, left and right).

The title should be typed in capitals (left alignment). The author's name (s) should precede the initials without scientific degrees or titles, the name of the presenting author should be underlined. The name, address, phone, Fax and e-mail numbers of the institution should be given on the separate line. Single spacing should be used.

The abstract should not exceed 2400 signs with spaces.

The abstract should be sent on a floppy disc (3,5` only) plus two printed copies. The disc should be labeled carefully with the author's name and the title of the abstract.

### **THE CONFERENCE SESSIONS;**

- I. Metabotropic receptors and cross-talk signalling
- II. Signalling in cell differentiation
- III. Immune system and intracellular signalling
- IV. Target enzymes
- V. Signalling mediated by ionotropic receptors, voltage dependent channels and low molecular weight molecules

### **ALL CORRESPONDENCE SHOULD BE ADDRESSED TO:**

**Organizing Committee of  
the 4<sup>th</sup> Parnas Conference  
30 Cybulskiego Str.  
50-205 Wrocław  
Phone: +48 71 328 82 46  
FAX: +48 71 375 92 13  
e-mail: drakus@biof.uni.wroc.pl**





# 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 „Postępkach 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 stworzonych 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 „Postępkach 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 ołówkiem 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 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, str. 541-553
4. Deleij J, Kesters K (1975) W: Florkin M, Stotz EH (red) *Comprehensive Biochemistry* t 29B. Elsevier, North-Holland, Amsterdam, str. 1-7
5. Franks NP, Lieb WR (1981) W: Knight CG (red) *Research Monographs in Cell and Tissue Physiology*, t. 7. Elsevier, North-Holland, Amsterdam, str. 243-272

**ILUSTRACJE:** ryciny 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 ołówkiem 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 „góra-dół” (ołówkiem, 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

## KOMUNIKAT ZARZĄDU GŁÓWNEGO

### POLSKIEGO TOWARZYSTWA BIOCHEMICZNEGO

Prosimy o wnoszenie opłat za składki członkowskie na nasze konto w PBK XIII Oddz. Warszawa nr 11101053-411050000371.

Jednocześnie uprzejmie informujemy, że decyzją Zarządu Głównego PTBioch. została zmieniona wysokość składki członkowskiej. W roku 2002 wynosi ona:

dla Członków rzeczywistych	70.- zł.
dla Członków studentów	35.- zł

**Członkowie, którzy opłacą składkę członkowską za rok 2002, otrzymają bezpłatną prenumeratę kwartalnika Polskiego Towarzystwa Biochemicznego „Postępy Biochemii”. Małżeństwa mogą opłacać: 70.- + 45.- = 115.-zł, otrzymają wówczas jeden egzemplarz „Postępów Biochemii”.**

Powyższe zmiany nie dotyczą Członków Honorowych Towarzystwa. Natomiast Członkowie-Emeryci – nadal zwolnieni z opłacania składki członkowskiej – płacą za prenumeratę „Postępów Biochemii” 25.- zł.

Biblioteki płacą za prenumeratę „Postępów Biochemii” w roku 2002 100.- zł.

## 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](mailto: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 Dariusz Stępkowski, 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

Dariusz Stępkowski

Sekretarz Zarządu Głównego  
Polskiego Towarzystwa Biochemicznego